



HAL
open science

Développement d'une approche de bio impression 3D intégrative, in situ et in vivo, pour la régénération osseuse

Nicolas Touya

► **To cite this version:**

Nicolas Touya. Développement d'une approche de bio impression 3D intégrative, in situ et in vivo, pour la régénération osseuse. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0327 . tel-04191345

HAL Id: tel-04191345

<https://theses.hal.science/tel-04191345v1>

Submitted on 30 Aug 2023

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTÉ

Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par **Nicolas TOUYA**

Développement d'une approche de bio-impression 3D intégrative,
in situ et *in vivo*, pour la régénération osseuse

Sous la direction de : **Pr. Raphaël DEVILLARD**

Soutenue le 02 décembre 2022

Membres du jury :

Mme. Anne DES RIEUX	Professeure des Universités	Université de Louvain	Rapportrice
M. Gilles SUBRA	Professeur des Universités	Université de Montpellier	Rapporteur
M. John LOPEZ	Ingénieur de Recherche	Université de Bordeaux	Examineur
M. Raphaël DEVILLARD	Professeur des Universités	Université de Bordeaux	Directeur
Mme. Olivia KEROUREDAN	Maître de Conf. des Universités	Université de Bordeaux	Invitée
M. Zoran IVANOVIC	Directeur Scientifique	EFS Nouvelle Aquitaine	Invité

Développement d'une approche de bio-impression 3D intégrative, *in situ* et *in vivo*, pour la régénération osseuse

Résumé : Face à l'enjeu de santé publique que demeurent les pertes osseuses, l'ingénierie tissulaire a pour objectif d'identifier et mettre au point des matériaux capables de restaurer le tissu osseux en respectant sa physiologie sur le long terme. La Bio-impression Assistée par Laser (LAB) fait partie des outils permettant la caractérisation, et la mise au point de nouveaux matériaux dans un contexte d'application *in situ* et *in vivo*. La première partie de ces travaux de thèse a été consacrée à l'étude d'une nouvelle encre-matériau, dont la formulation à base de silicium tricalcique et de collagène bénéficie d'une propriété de changement d'état sol-gel, afin de servir de substrat et de support rigide pour l'impression de cellules possédant un potentiel de régénération osseuse avantageux. Après une caractérisation *in vitro*, cette encre a pu être appliquée *in vivo* au sein d'un modèle de défaut critique de calvaria murine. La seconde partie de ce manuscrit s'inscrit dans une démarche d'ouverture de la versatilité de la technologie laser vers une utilisation multiple, en tant qu'outil de bio-impression, mais également pour la découpe et la texturation de tissu. Pour la première fois, l'impact de la texturation de tissu osseux pour offrir de nouvelles possibilités à l'interface os-greffon a été étudié. L'ensemble de ces travaux souligne l'intérêt et les nouvelles perspectives que continue de générer la technologie laser au service de l'ingénierie tissulaire.

Mots-clés : Ingénierie tissulaire, Bio-impression Assistée par Laser, Os, Cellules souches

In situ, in vivo integrative 3D bioprinting approach development for bone regeneration

Abstract: Faced with the public health issue of bone loss, tissue engineering aims to identify and develop materials that can restore bone tissue, while respecting its physiology on a long term perspective. Laser Assisted Bioprinting (LAB) is one of the tools used to characterize and develop new materials in a context of *in situ* and *in vivo* application. The first part of this thesis work was devoted to the study of a new ink-material, whose formulation based on tricalcium silicate and collagen benefited from a sol-gel state change property, in order to serve as rigid support and substrate to host and printed cells with an advantageous bone regeneration potential. After an *in vitro* characterization, this ink could be applied *in vivo* in a critical defect model of murine calvaria. The second part of this manuscript was part of a process of opening the versatility of laser technology towards a multiple use, as a bioprinting tool, but also for cutting and texturing tissue. For the first time, the impact of texturing bone tissue to offer new possibilities at the bone-graft interface has been studied. All these works underline the interest and the new perspectives that laser technology keeps on generating in the service of tissue engineering.

Keywords: Tissue engineering, Laser Assisted Bioprinting, Bone, Stem cells

UMR 1026 BIOTIS

Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux, France.

"Je ne sais pas si nous avons chacun un destin, ou si nous nous laissons porter par le hasard comme sur une brise, mais je crois... que c'est peut-être un peu des deux.

Peut-être qu'un peu des deux arrive en même temps ?"



Remerciements

Oh, hello there !

Bienvenue dans cet espace de remerciements. Je vais me permettre ici de prendre le temps de refaire le chemin parcouru jusqu'à la rédaction de ces lignes. Ayant envie de remercier tout le monde, suivre un ordre chronologique sera probablement le moyen le plus sûr de ne pas me perdre. Toutefois, un homme a si particulièrement influencé cette aventure vers la thèse qu'il m'est impossible de faire attendre son apparition.

Aussi mes premiers, et plus profonds remerciements s'adressent à Zoran Ivanovic. Un scientifique de valeur, un homme de parole. Je sais que vous êtes allergique à ces démonstrations exubérantes, ce qui rajoute encore à mon plaisir de vous faire subir l'honneur (l'outrage !) de figurer en tête ici. Merci d'avoir été, au moment le plus crucial de ma carrière, et de ma vie, l'incarnation du Mentor dont j'avais besoin. Parmi toutes les décisions que j'ai pu prendre, celle de vous écouter et de suivre votre confiance fut la meilleure et la plus bouleversante pour moi. Merci d'avoir cru en moi. J'espère m'en montrer toujours digne, et avoir un jour l'opportunité de transmettre ce que vous m'avez offert.

Il est temps de reprendre du début. Maman, je sais que tu ne m'en voudras pas d'avoir fait passer « Saint Zoran » avant toi. J'ai la chance d'avoir, avec mes deux parents, deux exemples à suivre. Deux démonstrations d'amour et de résilience très différentes, mais si complémentaires pour leurs enfants. Merci à toi Maman (Brigitte, pour la postérité) pour ta détermination sans faille et ton refus d'abandonner lorsque tu souhaitais le meilleur pour tes fils, quand ils ne savaient pas se battre seuls pour l'obtenir, ou baissaient les bras. Qui sait combien de portes seraient restées fermées sans toi ? Merci à toi Papa (Christian) pour tous les sacrifices auxquels tu as consenti pour t'assurer que nous ne manquions de rien et que nous ayons la possibilité de poursuivre nos ambitions. Pour la découverte du monde du travail à tes côtés, toujours en douceur, dans la joie et la bonne humeur (ceux qui le connaissent m'auront compris). Merci à tous les deux pour votre amour, et votre soutien que dix lignes ne pourront jamais résumer avec justice. Olivier, merci d'être MON grand frère. J'ai dû grandir pour percevoir combien j'avais appris de toi, et j'espère continuer à le faire. Nos différences font nos forces, et j'aurai toujours besoin de ton exemple. Je suis fier de toi. Je vous aime, tous les trois.

Merci à toute la famille et aux amis d'avoir été les figures modèles de mon enfance et d'aujourd'hui, en m'offrant chacun des outils pour me forger. Merci de m'avoir appris que les meilleures leçons ne sont pas dispensées à l'école, quel est le vrai sens du mot « valeur », et que rien de ce qui en a ne s'obtient sans effort.

Ami depuis le lycée, je souhaite remercier Gautier grâce à qui l'aller-retour en classe affaires pour passer 48h à Punta Cana en plein milieu de ma 3e année m'a valu depuis une réputation de vacancier perpétuel au laboratoire. Merci pour ces super souvenirs, on part où la prochaine fois ??

De ma première (et seule) année de licence générale, je remercie mes amis, mes frères,

mes capitaines, mes rois, toujours là : les trois autres pieds du tabouret Guillaume, Julien, Loïc. Il est une phrase qui dit « il y a 7 milliards d'abrutis sur la planète, et puis tu en prends quelques-uns, et tu te dis que ceux-là, c'est tes abrutis préférés ». Je trouve que ça nous confère un certain panache. Merci de m'avoir toujours écouté, compris, et encouragé (Merci Anaïs et Morgane aussi pour me les prêter de temps en temps). Cyrille, mon frère landais (allez, une petite thèse ? Après la diagonale des fous, ça manque de challenge pour toi, j'en conviens), merci pour le soutien de toujours. Robin, mon beau-frère de cœur, je te remercie, sponsor officiel de cette thèse avec le nourrissage au rougail-saucisse, les invitations aux matchs de l'UBB (et ce fada de lion), les soirées, le sport, les soins (plus jamais de palpé-roulé par pitié), et le rhum. J'ai pris 10kg, mais je n'ai jamais été aussi proche de devenir un athlète de haut niveau ! De toute façon, c'est TOI qui es beau !

Durant mon DUT à Quimper, je retiens l'impact de Tamara McNealy, ma tutrice de stage durant mon séjour à Clemson, qui fut la première à me plonger dans le monde de la recherche universitaire. Tamara, thank you very much for this introduction to academic research, which was an epiphany and led me through many decisions afterwards. Sur les bancs de l'IUT, j'ai peu de souvenirs, comme celui du jour où Tanguy a « cassé » la tour d'atomisation (mec, je pleure de rire rien qu'à écrire ça). En revanche, je garde tous les autres souvenirs qui font que cette période restera l'une des meilleures de mon cursus et de ma vie. Je tiens à remercier Solen, Saïf (binôme de choc), Cindy, Marine, Tanguy (le massacreur, vous avez peut-être entendu parler du jour où il a cassé la tour d'atomisation ?), Adrien, et Julie. On se retrouve chaque fois comme si on s'était quitté hier, ne changeons jamais ça.

Lors de ma licence professionnelle à Tours, il me reste surtout l'admiration forcée au Pr. Antoine Touzé, qui lors d'un TP ne sut retenir sa répartie face à ma question « Monsieur où dois-je ranger ce réactif ? » et me rétorqua un légendaire « j'ai bien une idée, mais ce ne sera pas la bonne température d'incubation ». Merci Antoine de m'avoir soutenu dans mes démarches de reprise d'études. Merci aussi à Jérémie, Solène et Lucile, les bordelais de la Lpro pour le soutien moral et culinaire avec des petits repas très bienvenus pendant la période de la thèse. Je réserve les remerciements de mon stage pour ceux du master, puisque j'ai effectué ces deux stages à l'EFS de Bordeaux dans la même unité, dirigée par Zoran.

Mes expériences professionnelles durant la période qui fait jonction avec mes études furent étrangement similaires, puisque j'ai eu la mission d'évaluer successivement la qualité de semences végétales chez Syngenta à Nérac, puis humaines au service BDR-CECOS du CHU de Bordeaux. D'ailleurs, merci Ludovic pour le coup de main pour poser mon CV au CHU. Monique, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour votre bienveillance, votre confiance, votre compréhension quand j'ai pris la décision de reprendre mes études. Sachez que je prends soin de votre voiture. Merci à Anna et Marianne, duo de choc, pour avoir pris soin de moi. Merci à Pierre, Réda, Simo, Edouard, Mariya, Juliette, Mathilde, et les autres internes de passage dans le service à cette époque. Enfin, merci à tout le reste des collègues pour ces deux années passées avec vous, qui ont été très formatrices pour moi.

Le prochain remerciement que je vais faire est très particulier, et peut-être le plus

important de la liste. Et si je tiens à remercier beaucoup de gens ici et à inviter le plus possible de gens à être là à l'occasion de ma soutenance, c'est aussi en raison de ce remerciement : Merci à Antonin, ancien doctorant à l'EFS de Bordeaux, de m'avoir invité à ta soutenance de thèse. C'est à cette occasion que j'ai pu revoir, 3 ans après, l'équipe de l'EFS. C'est à cette occasion que nous avons rediscuté avec Zoran, et qu'il m'a convié à aller lui rendre visite. A cette visite, Zoran m'a convaincu de reprendre mes études avec la promesse de me prendre en stage. Zoran a sollicité un rendez-vous avec le directeur de l'époque, monsieur Savineau (que je remercie), et s'est porté garant de ma réussite au master, et de me choisir comme stagiaire.

Sans Antonin, il est donc probable que je n'aurais pas repris mes études, ni rencontré les personnes suivantes. Un petit clin d'œil donc à l'ensemble de la promotion de Master : merci pour ces deux années, où vous m'avez aidé et épaulé dans ce parcours. Adrien et Lukas, camarades du Troupe, vous apparaissez un peu *in medias res* (celle-ci, c'est cadeau) mais vous savez combien vous avez compté et marqué mon retour à l'université après 3 ans dans la vie active. J'ai hâte de voir évoluer sur le terrain les grande jugadores que vous êtes devenus. A Mathilde, je te laisse le soin de faire le nécessaire pour que je puisse venir visiter Stockholm. Ne traîne pas.

Merci à toute l'équipe de l'EFS pour m'avoir accueilli durant 9 mois en tout, lors de mes stages de Lpro et de M2 ! Merci à Laura, Philippe, Marise, Véronique, Marija, Pascale, Jean, Elisabeth. Un petit merci supplémentaire en aparté à Véronique, pour m'avoir formé à l'enseignement à l'université (deux années de promotion d'élèves traumatisés te disent merci), pour ta gentillesse et ta confiance, et ta relecture de ce manuscrit.

Merci au crew du zoomba café-relais H du midi pendant la thèse Ewen (futur PU-PH), Amal, Matthieu, pour la douceur-plaisir du combo muffin-espresso servi par Damien ou Blandine (merci à eux aussi).

Nous arrivons au moment de la période de thèse ! Je commence cette partie en remerciant tout le laboratoire BIOTIS pour leur accueil. Merci à tous, de la première personne de l'unité que j'aie rencontrée, Evelyne, à qui j'ai apporté tout mon dossier de candidature en panique à 8h pétantes un matin, au NGB-Bioprinter de Poietis sur lequel j'étais sensé passer « la majeure partie de ma thèse » et qui arrivera après la fin de celle-ci, en passant par Anne-Marie, qui nous a toujours accueilli le matin avec le sourire. En réalité, la seule personne à qui je souhaite adresser des non-remerciements est Hugo, qui aura tout tenté pour ne jamais avoir plus de 5 secondes de conversation sérieuse avec moi, pour les mots sur l'ordi, les gestes discrets dans les couloirs, les concours de photomontages douteux... S'il te plaît, ne change rien (sauf peut-être certains hobbies comme l'escalade urbaine), tu as été une de mes raisons de venir travailler avec le sourire. Merci (et bravo) à Charles, pour supporter Hugo au quotidien d'abord, mais surtout pour m'avoir sauvé la mise plus de fois que je ne veux bien l'admettre. Merci pour ta patience, ta pédagogie (tu es mon dieu officiel de la physique des lasers, avec tout le respect que je dois à Townes), et tous les (bons) moments partagés autour de Novanase et Monulab, ou à l'occasion du réapprovisionnement de l'ART.

Je quitte Biotis mais je quitte surtout le Bureau des Légendes... Merci à Joanna (qui a parfumé de rose nos matinées et ma chaise jusqu'à quasiment laisser un trauma), à Mathilde (vous trouverez sa photo dans le dictionnaire à la définition du mot « résilience ». Encore une future Nobel, ça commence à être louche toutes ces Mathilde aussi brillantes...), à Naïma (GANBARE ! La plus forte, et pourtant tu n'utilises qu'1% de ta puissance au quotidien) et Quentin (Boss final des post-docs amateurs de métal et de bière). Tous les quatre avez été une source très précieuse de soutien, de rires, de nourriture (!!), mais aussi d'inspiration et de motivation. Je vous souhaite de tout cœur le meilleur pour la suite, chacun de vous le mérite amplement.

Quelques remerciements hors-catégorie avant de conclure (Attendez mais on est où là ? C'est la cérémonie des Oscars ces remerciements ou quoi ?) :

Je remercie la France, car cette thèse a été financée par la Région Nouvelle-Aquitaine. Chaque personne payant ses impôts qui lira ceci a donc participé au financement de mon salaire de thèse. Merci à vous, même si j'ai dû revendre la Ferrari qui était trop chère à l'entretien. Mais j'ai gardé la Rolex.

Je tiens à remercier Alexandra Elbakyan, fondatrice de Sci-hub, plateforme (illégale dans de nombreux pays) qui fournit sur internet un accès gratuit à la majorité des articles scientifiques. Alexandra if you read this (chances are low, but never zero), you are the closest definition to what a hero can be and you have my eternal admiration and respect. Alexandra et Sci-Hub incarnent les valeurs de partage et d'accessibilité universelle au savoir dont la science moderne s'est éloignée.

Pour terminer, j'adresse mes remerciements à ceux qui m'ont cotoyé au plus près dans mon travail. Merci à tous les stagiaires que j'ai eu le privilège d'encadrer et qui ont participé à la réalisation de ces travaux : Audrey, Laura, Mathilde (ouiii Mathiilde), Jules, Constance, Robine, Diane, et Mathilde Jr. Merci aussi à Manon, pour les longues discussions mais les manips courtes parce que rien ne marchait ! (toutes ces manips pour voir que finalement c'était le métaliseur qui déconnait, je ne m'en remettrai jamais)

Olivia, merci de m'avoir accueilli comme ton doctorant « successeur », tu m'as permis de me sentir tout de suite à l'aise et en confiance. Merci pour l'aide tout au long de la thèse, pour les avis, les relectures, les corrections. Merci Dr ORlivia KérouMidas (oui, c'est ton double bénéfique -au sens pécunier du terme-) d'avoir donné une partie de tes subventions pour que je puisse faire mes manips. Il faudra que tu me donnes ton secret pour que tout ce que je touche se transforme en or aussi !! Je te souhaite tout le meilleur pour cette aventure japonaise et la suite de ta carrière qui s'annonce RICHE d'évènements ! Et le meilleur aussi, surtout, pour toi et ta petite famille.

Enfin, à mon directeur de thèse, Raphaël, merci pour les leçons ~~de surf et d'escrime~~ de management enseignées dans ta vie à 300km/h, pour les ~~apéritifs et les réunions "camtar"~~ cette vision de la recherche partagée dans un cadre toujours soigné, et pour m'avoir appris à éditer proprement du texte sur Overleaf. J'ai du mal à réaliser que ces 3 années sont déjà terminées, et à mettre réellement les mots sur ma reconnaissance et l'enseignement que je retire de cette expérience unique que tu as supervisée. Je ne sais pas où le futur m'emmène, mais je serai toujours honoré d'avoir l'occasion de venir travailler mon take-off

avec toi.

Nous y sommes ! Cette thèse n'est pas la meilleure que vous pourrez lire, mais c'est celle que j'ai écrite, avec l'influence de tout mon parcours et des personnes qui m'ont formées (et, heureusement, des corrections faites par des relecteurs assidus que je remercie profondément (Bruno meu querido, Charles, Véronique)).

Merci à tous ceux qui ont été là hier. Merci à ceux qui sont là aujourd'hui. Merci à ceux qui seront là demain. Une page se tourne ici, et une autre débute.

Talga Vassternich

Je vous souhaite une bonne lecture.

Liste des abréviations

ALP : Phosphatase alcaline
BMP : Bone Morphogenic Protein
BMU : Basic Multicellular Unit
EAL/CAE : Energy Absorbing Layer, couche absorbante d'énergie
HA/nHA : (nano) Hydroxyapatite
hBMMSC : Cellules Souches Mésenchymateuses de la Moelle osseuse
HSC/CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IL : Interleukine
LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LIFT: Laser Induced Forward Transfert
MSC/CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses
Pi : Phosphate inorganique
Ppi : Pyrophosphate inorganique
PTH : Hormone Para Thyroïdienne
SCAPs : Stem Cells from Apical Papilla, cellules souches de la papille apicale
UV : Ultra-violets
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Sommaire

1	Introduction	1
1.1	Le tissu osseux	2
1.1.1	Anatomie et classification	2
1.1.2	Structure, composition, fonctions	3
1.1.3	Biologie du tissu osseux : dynamique physiologique et acteurs cellulaires impliqués	7
1.2	Régénération du tissu osseux	15
1.2.1	Les traumatismes et pathologies du tissu osseux	15
1.2.2	La réponse physiologique consécutive à la fracture	16
1.2.3	Le défaut osseux critique	19
1.2.4	Les stratégies de réparation	19
1.2.5	L'ingénierie tissulaire	29
1.2.6	Ingénierie du tissu osseux	30
1.3	Biofabrication en ingénierie tissulaire - 20 ans de rétrospective	33
1.3.1	Contexte historique et définitions	33
1.3.2	La bio-impression	34
1.3.3	Scaffolds, encres et cellules des bioencres	40
1.4	La Bio-impression Assistée par Laser	45
1.4.1	Origine historique du LASER	45
1.4.2	Le LIFT, précurseur de la Bio-impression Assistée par Laser	47
1.4.3	Adaptations du LIFT vers la biologie	48
1.4.4	Mécanismes clés et contraintes relatives à la Bio-impression Assistée par Laser	51
1.5	Imprimer <i>in situ</i> , <i>in vivo</i> : vers un nouveau paradigme de réparation du tissu osseux	56
2	Antériorité des travaux & Objectifs	59
2.1	Antériorité des travaux	59
2.1.1	La station d'impression NOVALASE	59
2.1.2	Historique des travaux de bio-impression laser	59
2.2	Objectifs de la thèse	62
3	Développement d'une formulation d'encre-matériau à base de silicium tricalcique pour la régénération osseuse	63
3.1	Les composés à base de Silicium pour la réparation osseuse	63
3.1.1	Introduction	63

3.1.2	Original review: <i>In vivo</i> application of silica-derived inks for bone tissue engineering: a 10-years systematic review	64
3.1.3	Conclusion	88
3.2	Les silicium tricalciques et le BioRoot	88
3.3	Caractérisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> d'une nouvelle encre à base de silicium tricalcique <i>via</i> Bio-impression Assistée par Laser pour la réparation osseuse	89
3.3.1	Introduction	89
3.3.2	Original article : " <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> characterization of a novel tricalcium silicate-based ink for bone regeneration using laser-assisted bioprinting"	90
3.3.3	Conclusion	105
4	Applications transversales du laser au service de l'ingénierie du tissu osseux	106
4.1	Le laser comme outil de découpe	106
4.2	Le laser comme outil de texturation	107
4.3	Utilisation de la technologie laser pour texturer du tissu osseux : vers une nouvelle vision de l'interface os-implant	109
4.3.1	Introduction	109
4.3.2	[Pre-print] Original article: "Bone laser patterning to decipher cells organization"	110
4.3.3	Conclusion	124
5	Discussion	125
5.1	Choix des modèles utilisés	125
5.1.1	Le modèle cellulaire	125
5.1.2	Le modèle de défaut critique osseux dans une calvaria murine	126
5.2	Formulation de l'encre à base de silicium tricalcique	126
5.3	Cibles thérapeutiques actuelles et perspectives	128
5.4	La technologie de Bio-impression Assistée par Laser	129
6	Conclusion & Perspectives	133
6.1	Retour sur les travaux menés, axes d'amélioration et pistes pour de futurs travaux	133
6.2	<i>From bench to bedside ?</i> Contribution à l'ingénierie tissulaire et réflexion autour de l'impression laser	134

Table des Figures

1	Le squelette humain	2
2	Mécanismes des ossifications endoconjonctive (a) et endochondrale (b), par Zhu <i>et al.</i> [3]	3
3	Hier et aujourd'hui - évolution de l'observation microscopique de l'os. Des dessins de Howship en 1816 (gauche)[4] à l'acquisition par microscopie électronique à balayage (Shah <i>et al.</i> , 2019)[5] pour élucider l'organisation structurelle du tissu osseux	4
4	Modules de Young de différents organes, basé sur la revue de Guimarães <i>et al.</i> [6]	4
5	Architecture multi-échelle du tissu osseux, de l'échelle macroscopique à l'organisation moléculaire, Gao <i>et al.</i> [12]	5
6	Composition minérale et organique de l'os, Murugan <i>et al.</i> [20]	6
7	La synthèse cellulaire d'hydroxyapatite pour la minéralisation osseuse, Murshed <i>et al.</i> [30]	8
8	Différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses vers un phénotype de minéralisation: ossification endochondrale (bleu) <i>versus</i> endoconjonctive (rouge), Galea <i>et al.</i> [2]	9
9	Section transversale du tissu osseux (dessus) révélant l'organisation structurelle de la vascularisation en os long, Naish <i>et al.</i> [43] . Représentation schématique (gauche) et reconstruction histologique (droite) du système vasculaire (en vert: CD31; en rouge: endomucine) d'une calvaria de souris, d'après Rindone <i>et al.</i> [44].	10
10	Innervation du tissu osseux : acteurs impliqués, distribution des neurones sensoriels et densité des fibres nerveuses au sein du tissu osseux, Marrella <i>et al.</i> [47]	11
11	Distribution des moelles dites rouge et jaune selon l'âge des individus, Chan <i>et al.</i> [54]	12
12	Les étapes du remodelage osseux	13
13	Les motifs de fracture, calqué sur McGuigan [78]	15
14	Étapes de réparation physiologique post-fracture	17
15	Nombre de greffes effectuées en France en 2020, rapport de l'Agence de la Biomédecine	20
16	Évolution de l'activité de tissus en France entre 2016 et 2020, rapport de l'Agence de la Biomédecine	22
17	Variétés d'orthophosphates de calcium, Dorozhkin [120]	25
18	Composition des bioverres (haut), Crush <i>et al.</i> [123] et interaction physiologique avec l'os, Zhou <i>et al.</i> [124]	26

19	Mécanismes cellulaires d'action du Silicium par activation de l'autophagie décrite par Ha <i>et al.</i> [134] et par inhibition de NF-KB rapportée par Zhou <i>et al.</i> [135]	27
20	Performance des substituts osseux comparativement à des stratégies de greffe, Giannoudis <i>et al.</i> [118]	28
21	Schéma heuristique des acteurs et mécanismes majoritaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie osseuse	31
22	Fabrication additive - Les procédés d'impression 3D, d'après la norme ISO/ASTM52900-21 sur https://hybridmanutech.com/resources/ , utilisé avec la permission de Hybrid Manufacturing Technologies	32
23	Place de la Biofabrication parmi l'ingénierie tissulaire, Groll <i>et al.</i> [139] .	33
24	Répartition des technologies de bio-impression et tendances évolutives des 20 dernières années du nombre de publications associées à la bio-impression [143–145].	35
25	Répartition des principales technologies de bio-impression par la taille de résolution et le volume du matériel transféré, inspiré par De Oliveira et Catros <i>et al.</i>	36
26	Spécificités des principales technologie de bio-impression, Knowlton <i>et al.</i> [150]	38
27	Tissus cibles de l'utilisation des technologies de bio-impression, par Santoni <i>et al.</i> et Gonzalez <i>et al.</i> [143, 144]	39
28	Techniques de bio-impression et pré-réquis des bioencres, Cally <i>et al.</i> [152]	40
29	Sources, identités et phénotypes des cellules souches dérivées des tissus dentaires d'après Kong <i>et al.</i> [176]	44
30	Principe de fonctionnement de l'emission stimulée de rayonnement. . . .	46
31	Représentation schématisée d'un système de pompage optique et amplification de lumière par émission stimulée de rayonnement	47
32	Dispositif de LIFT (gauche) et dépôt de cuivre sur surface receveuse (droite), extrait de Bohandy <i>et al.</i> , 1986	48
33	Répartition des types d'encres utilisées en LIFT entre 2010 et 2018 (groupe <i>other</i> : thrombine, gélatine, laminine, et Matrigel ; HA: Acide Hyaluronique), Antoshin <i>et al.</i> [202]	49
34	Ensemble des dispositifs de transferts de matières assistés par Laser utilisés en Biologie, repris et modifié de Kerourédan <i>et al.</i> , 2018	51
35	Reproduction <i>in silico</i> d'observations par ombroscopie de la formation de jets liés à la dynamique de la bulle de cavitation à une interface eau/air, repris et adapté de Cerbus <i>et al.</i> [213]	52
36	Formation du jet, adapté de Antoshin <i>et al.</i> [202]	54
37	Régimes de jets, adapté de Antoshin <i>et al.</i> [202]	55
38	Outils d'impression <i>in situ</i> appliqués chez l'animal. Extrusion de matériau chez le cochon nain pour combler un défaut osseux (haut), de Li <i>et al.</i> [225]; <i>BioPen</i> (milieu), extrusion pour reconstruction cartilagineuse chez le mouton Di Bella <i>et al.</i> [226] et droplet (bas) pour la régénération cutanée chez la souris et le porc, Albanna <i>et al.</i> [227]	58
39	Les applications médicales de la technologie laser, de Khalkhal <i>et al.</i> [282]	107

40	Interface implant/tissu osseux, Liu <i>et al.</i> [297]	108
41	Les paramètres modulés par le recours à la texturation à différentes échelles, adapté de Sirdeshmukh <i>et al.</i> [292]	108
42	Concept d'application d'une texturation laser <i>in situ</i> pour la création d'une interface os-implant	110
43	Ensemble des sources lasers et EAL associées dans la revue de Antoshin <i>et al.</i>	130

Chapitre 1

Introduction

Les travaux de cette thèse étant dédiés à l'ingénierie du tissu osseux et présentés sous la forme d'une thèse sur articles, l'état de l'art en constituera l'introduction. La première partie de cette introduction sera consacrée à la définition du tissu osseux. Dans un effort de compréhension des enjeux abordés par le sujet de cette thèse, les principes physiologiques sur lesquels repose la régénération du tissu osseux seront abordés. Ensuite, les cas de régénération incomplète ou associée à des complications médicales seront décrits, avant de faire un état des lieux des solutions thérapeutiques actuelles dans le but de pallier la perte osseuse. Présentée comme champ de recherche alternatif aux solutions thérapeutiques standard, l'ingénierie tissulaire sera définie, puis l'ingénierie du tissu osseux sera plus spécifiquement détaillée ; la notion de biofabrication, sous-ensemble technologique de l'ingénierie tissulaire, fera l'objet d'un rapide développement au profit d'une explication détaillée de la technologie de la Bio-impression Assistée par Laser, de ses fondations physiques théoriques à son application actuelle dans un contexte de réparation osseuse. En dernier lieu de cette introduction, l'intégration de la bio-impression comme technologie de médecine régénérative *in situ* et *in vivo* sera présentée, avec pour perspective l'application clinique de cet outil.

Dans ce contexte de régénération du tissu osseux par des moyens d'ingénierie tissulaire, de nombreuses pistes sont proposées pour obtenir un substitut idéal, qu'il soit naturel, synthétique ou hybride. Parmi celles-ci, l'analyse de la littérature par une revue systématique a mis en évidence l'effet positif de l'utilisation du silicium dans l'élaboration de biomatériaux pour la régénération osseuse. Cette prospection bibliographique a été valorisée au travers d'une publication internationale. Ainsi, le développement et la caractérisation d'une encre à base de silicium adaptée au processus d'impression *in situ*, *in vivo* assistée par laser a été choisi comme objectif principal de ces travaux de thèse et fait l'objet du premier article publié.

Enfin, l'ambition de moyen-terme du laboratoire est de développer une plateforme multimodale basée sur l'utilisation versatile du laser comme moyen d'impression, mais également comme outil chirurgical de découpe et de texturation. En ce sens, et comme deuxième objectif de thèse, des travaux ont été menés pour la première fois afin d'étudier l'impact d'une modification par laser de la surface d'un os sur des cellules compétentes pour régénérer le tissu osseux. Cet effort collaboratif avec la société ALPhANOV apporte un regard original sur l'interface entre tissu osseux et biomatériau ou greffon, par la modification directe *in situ*, du tissu osseux natif. Ce projet a été valorisé par la soumission d'un article.

1.1 Le tissu osseux

1.1.1 Anatomie et classification

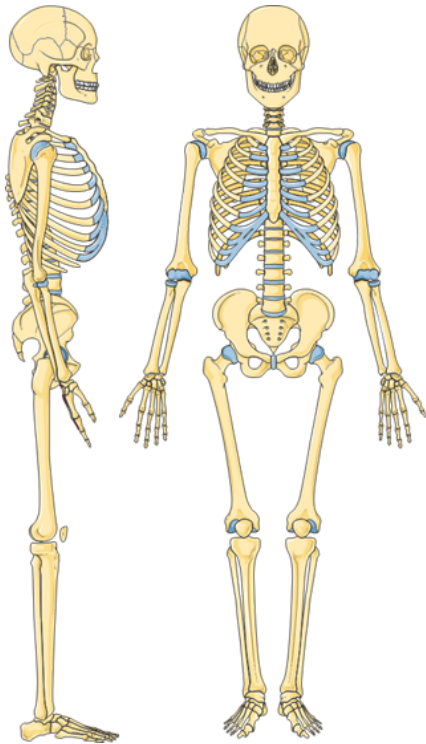


Figure 1: Le squelette humain

Le squelette humain adulte (Figure 1) est composé de 206 à 213 os (selon les standards de numération), en excluant les os sésamoïdes issus de calcification ligamentaire [1]. On distingue notamment le squelette appendiculaire, constitué des 126 os des membres supérieurs, inférieurs, et de la ceinture osseuse, le squelette axial constitué de 74 os, et enfin les 6 osselets de l'oreille. L'ensemble des os peut être divisé en quatre sous-catégories : os longs, os courts, os plats, et os irréguliers.

Parmi les os longs, on trouve les clavicules, humérus, radius, cubitus, métacarpes, et fémurs, tibias, péronés, métatarses et phalanges. Les os courts sont les carpes et tarses et les rotules (les os sésamoïdes sont considérés comme courts). Les os plats rassemblent le crâne, les mâchoires, les omoplates, le sternum et les côtes. Enfin, les os irréguliers regroupent les vertèbres, le sacrum, le coccyx, et l'os hyoïde.

On oppose les os longs aux os plats par leur processus d'ossification lors de l'ostéogenèse

[2] (Figure 2): les os plats sont générés par ossification dite endoconjonctive, endomembraneuse ou intramembranaire, qui consiste en la minéralisation directe du mésenchyme. L'ossification endochondrale quant à elle concerne les os longs, et passe par une étape de formation d'un châssis cartilagineux inséré dans une gaine fibroblastique avant de connaître un remodelage vers un tissu minéralisé par différenciation des acteurs cellulaires impliqués.

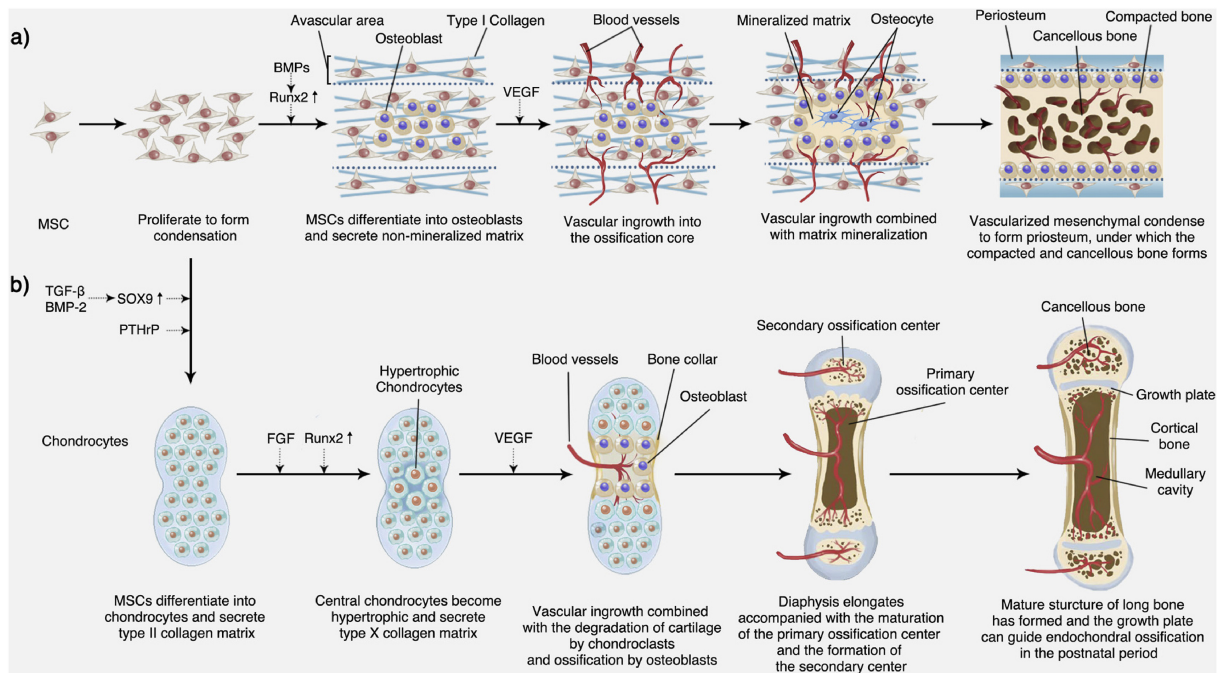


Figure 2: Mécanismes des ossifications endoconjonctive (a) et endochondrale (b), par Zhu *et al.* [3]

Bien que le procédé d'ossification diffère entre os plats et os longs, le tissu osseux mature final dispose d'une structure et d'une composition similaires, dont les différences sont conçues pour remplir des fonctions spécifiques.

1.1.2 Structure, composition, fonctions

Structure osseuse

Le tissu osseux revêt trois rôles fondamentaux, assurés par sa structure et sa composition. Depuis les premières observations microscopiques rapportées par dessin aux débuts du 19e siècle [4] jusqu'à l'utilisation de microscopie électronique pour assister les recherches contemporaines [5], le tissu osseux a été abondamment décrit dans la littérature (Figure 3).

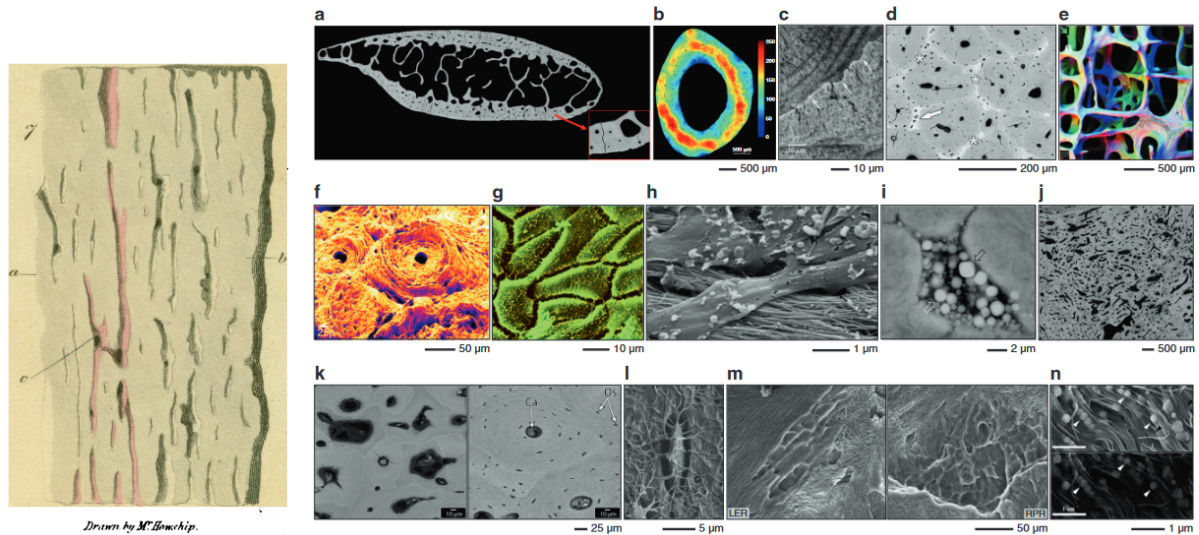


Figure 3: Hier et aujourd'hui - évolution de l'observation microscopique de l'os. Des dessins de Howship en 1816 (gauche)[4] à l'acquisition par microscopie électronique à balayage (Shah *et al.*, 2019)[5] pour élucider l'organisation structurelle du tissu osseux

Sur un plan macroscopique, l'os mature est l'organe le plus rigide de l'organisme [6], avec un module de Young de l'ordre de 10-20 GPa [7] (comparable au module de Young d'une brique), offrant la plus grande capacité de résistance face à une contrainte mécanique donnée (Figure 4). A l'échelle du tissu, seul l'émail dentaire dispose d'une rigidité plus grande (90GPa) [8].

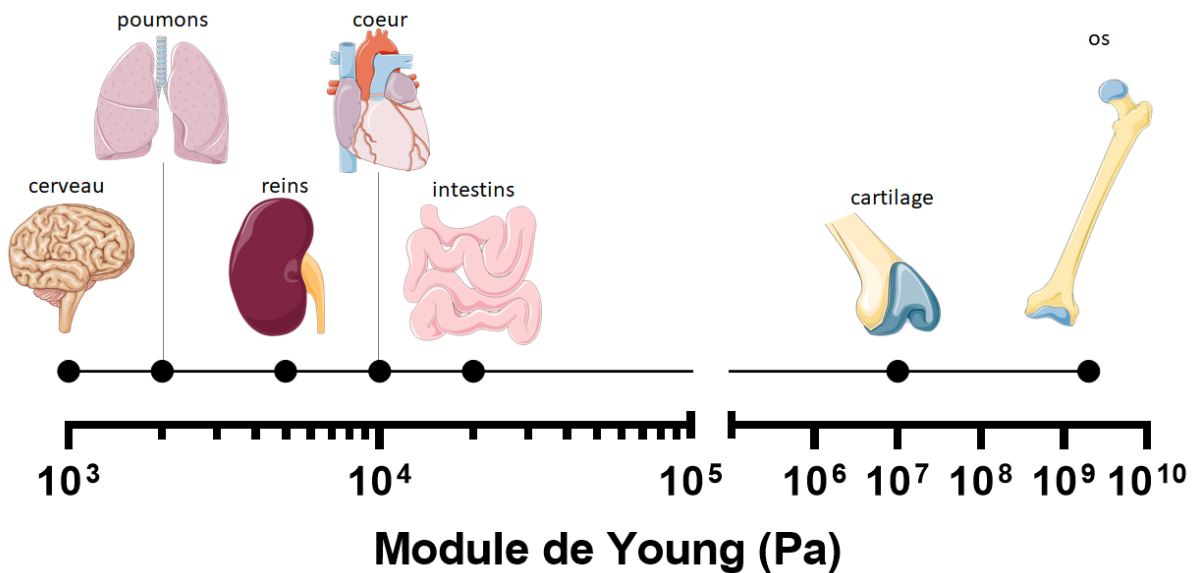


Figure 4: Modules de Young de différents organes, basé sur la revue de Guimarães *et al.*[6]

Grâce à cette propriété, le tissu osseux exerce ainsi le rôle de soutien structurel et de protection des organes, premier de ses trois rôles fondamentaux (avec la régulation de

l'homéostasie phosphocalcique, et la régulation de l'hématopoïèse). Cette rigidité et cette fonction lui sont permises par l'architecture spécifique de ce tissu (Figure 5): à l'échelle nanométrique, elle est initiée par la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite [9] sur des fibres de collagène organisées en polypeptides: le tropocollagène. Ces fibres de collagène ainsi minéralisées, en s'organisant en lamelles [10], vont générer l'architecture de l'os. Lorsque les lamelles s'organisent de manière concentrique autour d'une lumière, le canal de Havers, la structure résultante de cet agencement est l'ostéon. L'ensemble des ostéons, organisé de manière très dense, forme l'os cortical. Lorsque les lamelles s'organisent en trabécules [11], c'est l'os trabéculaire (ou "os spongieux") qui est formé.

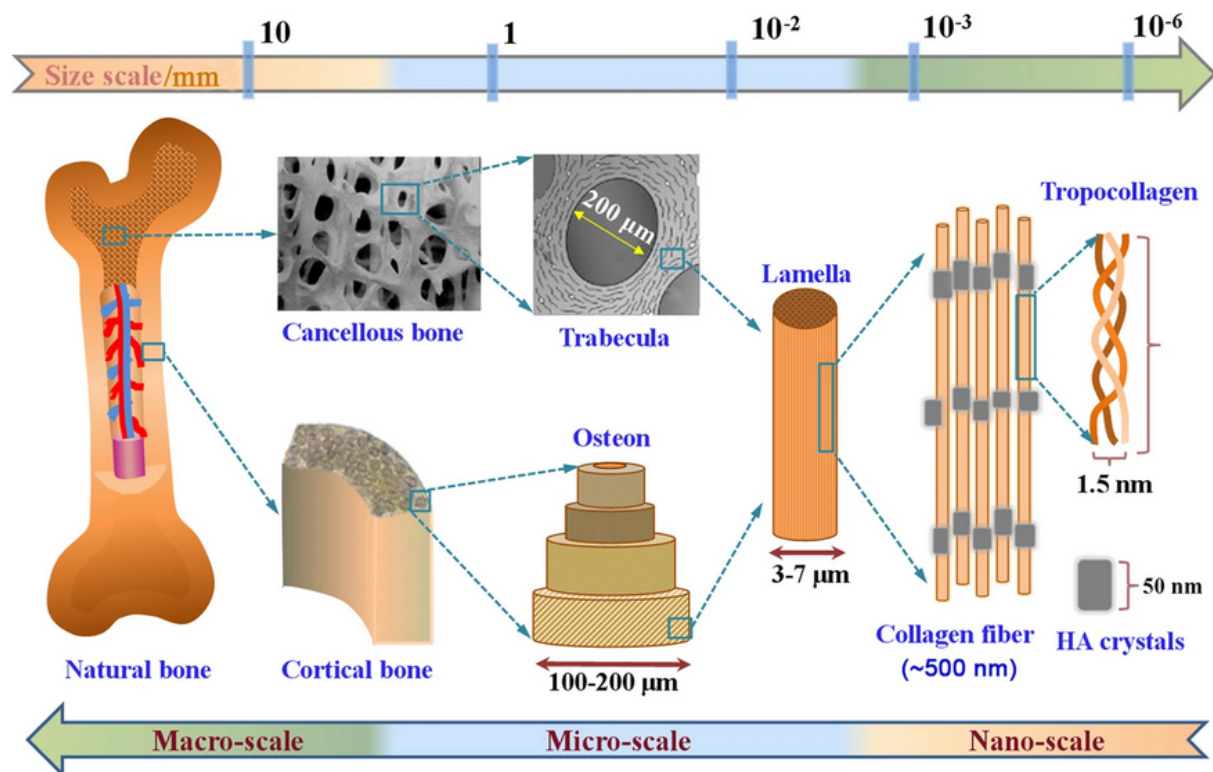


Figure 5: Architecture multi-échelle du tissu osseux, de l'échelle macroscopique à l'organisation moléculaire, Gao *et al.* [12]

L'os cortical, plus communément appelé "os compact" constitue la couche externe du tissu osseux, et contribue pour 80% de la masse osseuse, avec une densité très élevée et une faible porosité. A l'intérieur de l'os, la structure trabéculaire quant à elle représente 20% de la masse osseuse, avec une porosité variable mais largement supérieure (50 à 90%) à celle de l'os cortical [13].

L'os est un organe richement vascularisé, et l'apport et la diffusion en nutriments et oxygène au travers du tissu est médié par un système vasculaire empruntant les canaux de Havers et les canaux de Volkmann [14], structures permettant également l'innervation du tissu osseux [15].

C'est tout cet ensemble architectural [16] comprenant l'os cortical, trabéculaire, et la géométrie des systèmes haversiens qui le traversent, qui va définir les propriétés mécaniques du tissu osseux à l'échelle macroscopique [17, 18]. Mais cette architecture est également influencée par les contraintes qu'elle reçoit, et s'y adapte dans la durée [19].

Composition inorganique/minérale

Comme évoqué ci-avant, l'os est l'organe le plus rigide de l'organisme, grâce à la minéralisation du mésenchyme lors de l'ossification. Cette minéralisation se fait par la formation de cristaux d'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Cette hydroxyapatite représente $\simeq 60\%$ du poids total du tissu osseux, et la grande majorité du poids total de matière inorganique qui compose ce tissu [20] (Figure 6). On trouve ensuite du carbonate ($\simeq 5\%$ du poids total), du citrate ($\simeq 0.9\%$), puis des traces de divers éléments (Na, Mg, Cl, F, K, Sr, Pb, Zn, Cu, Fe pour un cumul $< 1.5\%$ du poids total) Dans l'os mature, la matrice organique est principalement constituée de collagène ($\simeq 20\%$ du poids total), de protéines non-collagéniques ($\simeq 3\%$), et d'eau ($\simeq 9\%$).

Table 1
The composition of bone^a

Inorganic phase	wt%	Organic phase	wt%
Hydroxyapatite	~ 60	Collagen	~ 20
Carbonate	~ 4	Water	~ 9
Citrate	~ 0.9	Non-collagenous proteins (osteocalcin, osteonectin, osteopontin, thrombospondin, morphogenetic proteins, sialoprotein, serum proteins)	~ 3
Sodium	~ 0.7		
Magnesium	~ 0.5		
Other traces: Cl^- , F^- , K^+ , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}		Other traces: Polysaccharides, lipids, cytokines Primary bone cells: osteoblasts, osteocytes, osteoclasts.	

Figure 6: Composition minérale et organique de l'os, Murugan *et al.* [20]

Au-delà de la rigidité intrinsèque que confère la forme cristallisée de calcium et de phosphate, ces deux éléments du tissu osseux exercent un rôle fondamental dans l'homéostasie calcique et phosphorique de l'organisme [21]. En effet, les tissus osseux contiennent 99% du calcium total [22], et 85% du phosphore total [23] de l'organisme. La régulation de ces deux éléments à l'échelle de l'organisme se fait donc essentiellement par l'intermédiaire des tissus osseux.

Le ratio molaire Ca/P est variable chez l'humain selon les sites de mesure, mais avec des moyennes supérieures à 2.2 [24, 25], ce qui est supérieur à la valeur théorique de 1.67 correspondant au ration Ca/P de l'hydroxyapatite. Les anomalies de valeur de ce ratio, d'origine pathologique ou alimentaire, exercent une influence sur l'homéostasie du tissu osseux. De plus, tandis qu'une alimentation supplémentée en calcium permet de réduire le risque de fracture [26], des carences en Ca et P ont été corrélées à l'augmentation des risques associés aux traumatismes osseux et à divers troubles métaboliques. [27].

L'os, siège de la niche hématopoïétique

Enfin, le troisième rôle fondamental du tissu osseux est de servir de niche aux cellules souches hématopoïétiques. Le terme de niche désigne ici un micro-environnement avec une localisation, une composition et une fonction spécifiques. La niche hématopoïétique, au contact de l'os trabéculaire, possède la particularité d'abriter les cellules souches qui sont à l'origine de la production tout au long de la vie des progéniteurs lymphocytaires, des érythrocytes et des plaquettes [28] : les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). Cette niche endostéale est un lieu de maintien et de préservation de l'état indifférencié de ces cellules souches. S'il reste un environnement mal élucidé, il dispose de caractéristiques physiologiques uniques [29] à l'interface d'autres cellules, telles que les cellules souches mésenchymateuses (CSM).

L'os est un tissu vivant, dont l'homéostasie dépend des interactions et des fonctions des éléments biologiques qui le composent, constitués par un ensemble d'acteurs cellulaires.

1.1.3 Biologie du tissu osseux : dynamique physiologique et acteurs cellulaires impliqués

La minéralisation du tissu osseux

Comme décrit précédemment de façon succincte, le tissu osseux est composé à 60% d'hydroxyapatite. Dans un environnement de matrice collagénique, la minéralisation est régie par la disponibilité de Ca^{2+} , et de phosphate inorganique (Pi) [30]. Cependant, le phosphate est majoritairement disponible sous la forme de pyrophosphate (PPi), qui ne permet pas la réaction de synthèse de l'hydroxyapatite, et qui doit être clivé en 2 Pi. Cette réaction enzymatique se fait principalement sous l'action de la phosphatase alcaline (ALP) (Figure 7). En rendant disponible le Pi, la réaction de cristallisation de l'hydroxyapatite est spontanée [31]. Il existe une voie alternative de formation d'hydroxyapatite, qui utilise des phospholipides comme source de Pi plutôt que le PPi, lesquels sont clivés sous l'action de PHOSPHO1 [32].

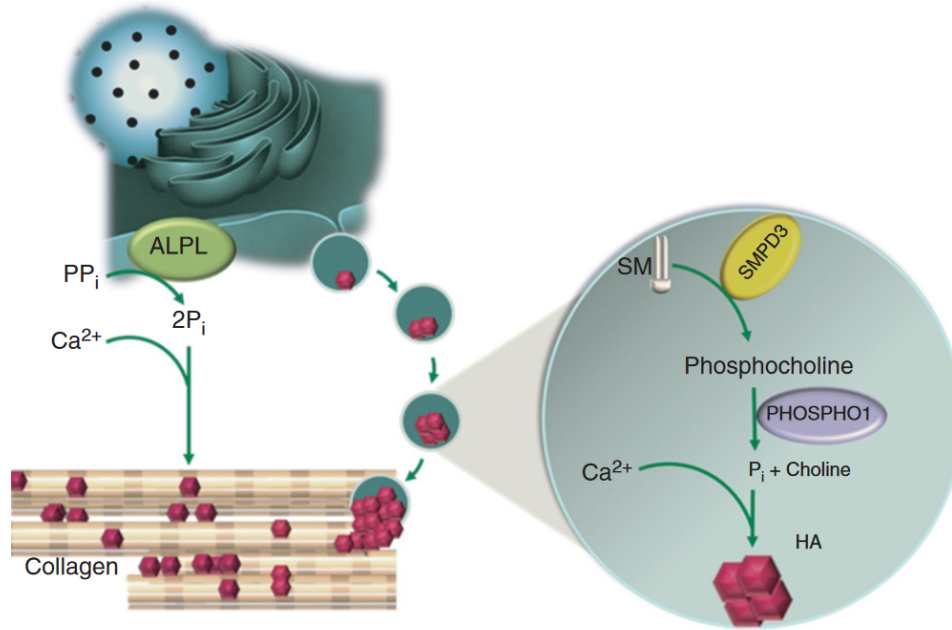


Figure 7: La synthèse cellulaire d'hydroxyapatite pour la minéralisation osseuse, Murshed *et al.*[30]

Ainsi, la présence de phosphatases/phosphodiesterases est déterminante pour la formation de l'hydroxyapatite. Dans le tissu osseux, ces enzymes sont disponibles par l'intermédiaire de cellules spécialisées.

Lors de l'ossification, les cellules qui vont permettre la minéralisation du tissu par leur activité de phosphatase proviennent toutes de progéniteurs mésenchymateux directement différenciés en ostéoblastes dans le cas de l'ossification endoconjonctive. Dans le cas de l'ossification endochondrale, ces progéniteurs subissent d'abord une différenciation en chondroblastes qui seront à l'origine de la matrice cartilagineuse, puis subiront une transdifférenciation vers la lignée ostéoblastique [33] (Figure 8).

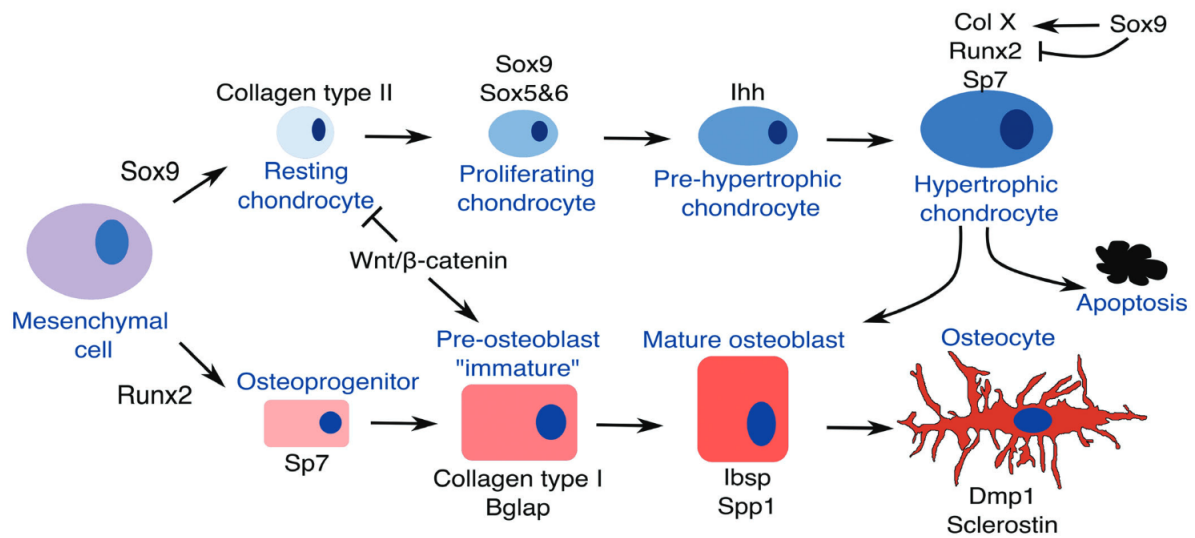


Figure 8: Différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses vers un phénotype de minéralisation: ossification endochondrale (bleu) *versus* endoconjonctive (rouge), Galea *et al.* [2]

Dans le tissu osseux, les ostéoblastes possèdent un phénotype d'induction de minéralisation [34] par leur sécrétion de protéines fondamentales de la matrice osseuse [35], incluant le collagène de type I et la phosphatase alcaline à des taux significativement plus élevés que d'autres lignées cellulaires [36]. C'est pourquoi les populations dites "ostéoblastiques", qui regroupent l'ensemble des cellules disposant d'une activité phosphatase alcaline supérieure sont les plus étudiées.

Vascularisation du tissu osseux

A l'instar du reste de l'organisme [37, 38], l'acheminement de l'oxygène et des nutriments essentiels à la survie des cellules à travers l'os [39] est permis par la perfusion de sang au moyen d'un système vasculaire très développé et à moins de 100µm des éléments cellulaires [40] (Figure 9). Ce système vasculaire est estimé représenter à $2.2\% \pm 1.0\%$ de la masse totale de l'os cortical, pour une densité vasculaire de 0.68 ± 0.27 vaisseau/mm³ de tissu osseux [41]. Les données concernant la densité vasculaire au sein de l'os médullaire varient selon les modèles et les sources [42], cette densité serait d'un ordre entre une dizaine et quelques centaines de vaisseaux/cm².

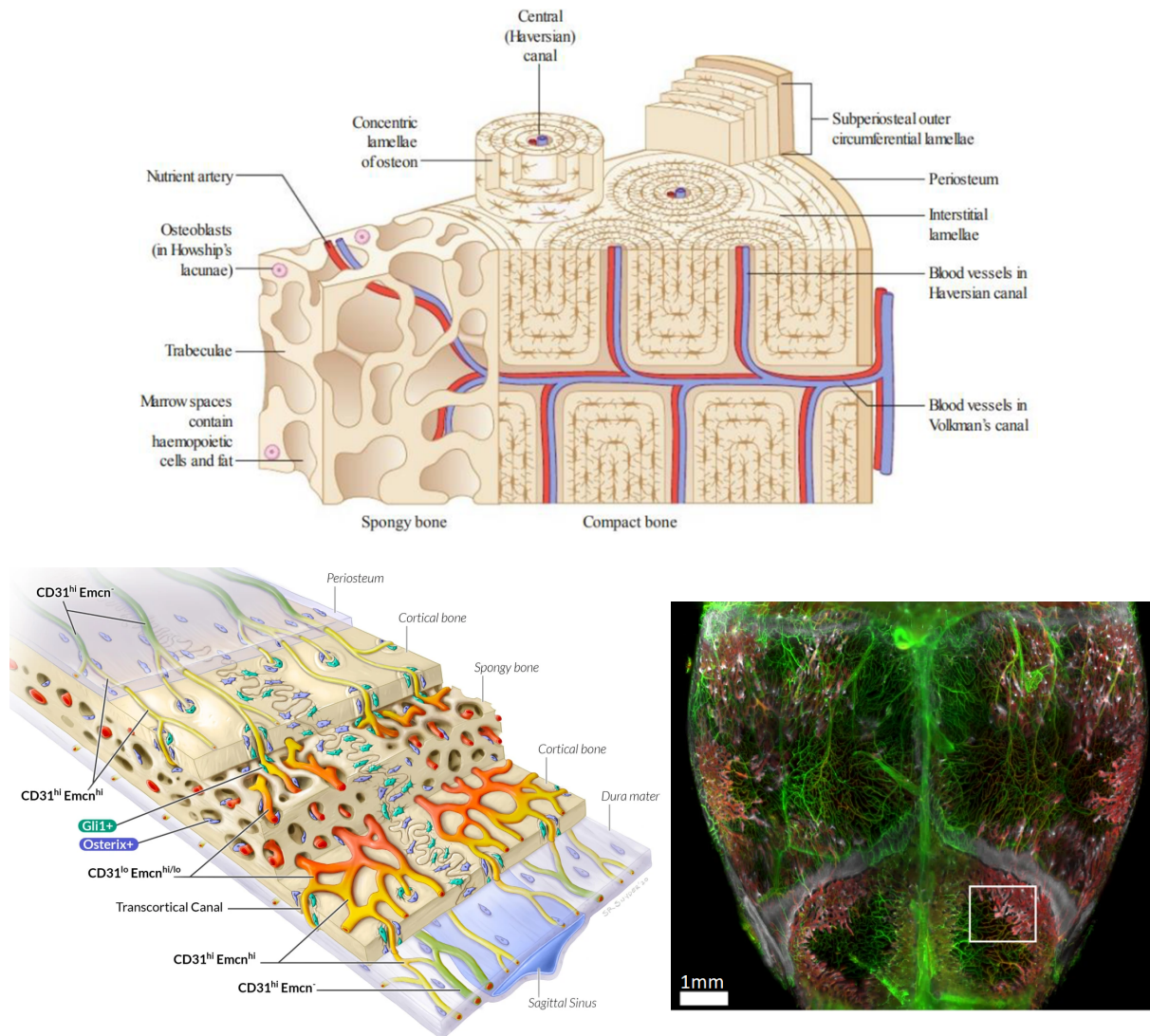
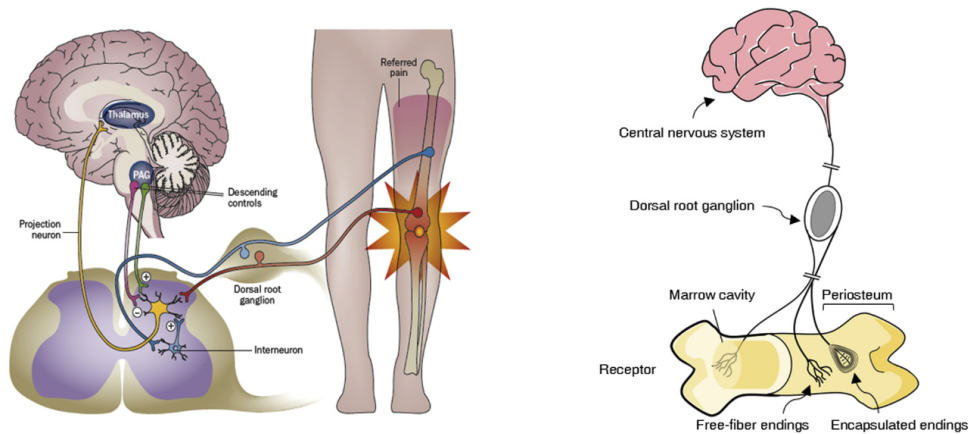


Figure 9: Section transversale du tissu osseux (dessus) révélant l'organisation structurelle de la vascularisation en os long, Naish *et al.* [43]. Représentation schématique (gauche) et reconstruction histologique (droite) du système vasculaire (en vert: CD31; en rouge: endomucine) d'une calvaria de souris, d'après Rindone *et al.* [44].

La vascularisation est un élément clé du maintien de l'homéostasie osseuse: outre l'apport de l'oxygène et des nutriments, le flux sanguin permet l'évacuation des métabolites secondaires et déchets liés à l'activité cellulaire du tissu. De plus, le recrutement des MSC ou la mobilisation des CSH s'effectue en grande partie par la diffusion de chemokines circulantes dans le plasma sanguin [45]. La richesse de communication entre cellules vasculaires/endothéliales et cellules ostéoblastiques est également à l'origine d'une potentialisation de l'angiogenèse et de la minéralisation [46].

Innervation du tissu osseux

Le système nerveux est relié au tissu osseux majoritairement par des nerfs sensoriels [47], et par des nerfs autonomes [48]. La communication entre thalamus et substance grise périaqueducale (PAG) d'un côté, et tissu osseux de l'autre est faite au niveau des ganglions spinaux où se situent les corps cellulaires des neurones qui font la jonction entre tissu osseux et moelle épinière (Figure 10).



Density and total number of nerve fibers at mineralized bone, bone marrow, and periosteum [123].

	Mineralized bone			Bone marrow			Periosteum		
	Proximal head	Diaphysis	Distal head	Proximal head	Diaphysis	Distal head	Proximal head	Diaphysis	Distal head
Innervation density (fibers/mm ²)	20.3	15.9	2.1	21.4	10.4	9.9	117.0	73.1	177.4
Total number of nerve cells (mm ³)	2.86	4.62	3.37	4.97	10.27	4.62	0.06	0.09	0.07

Figure 10: Innervation du tissu osseux : acteurs impliqués, distribution des neurones sensoriels et densité des fibres nerveuses au sein du tissu osseux, Marrella *et al.* [47]

L'innervation du tissu osseux est très largement associée à un rôle de nociception, mais son implication dans des mécanismes de croissance [49] ou de régénération [50] a été rapportée. Majoritairement absente dans le développement de matériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse, la question de l'innervation du tissu endommagé n'en demeure pas moins fondamentale pour appréhender une vue d'ensemble fidèle à l'aspect physiologique du tissu osseux.

Moelle osseuse, niche endostéale et cellules souches

Au coeur de la structure osseuse, dans l'os trabéculaire, se trouve la moelle osseuse. L'on distingue deux types de moelle, "rouge" et "jaune". Le terme de niche endostéale s'applique davantage à la moelle rouge, qui revêt une fonction particulière: partiellement décrite précédemment à propos de son rôle à l'échelle de l'organisme, la niche endostéale est constituée d'un ensemble de progéniteurs hématopoïétiques et mésenchymateux (55%),

et d'adipocytes (45%) [51]. L'ensemble des cellules souches hématopoïétiques évoquées plus haut, qui possèdent la capacité de s'auto-renouveler à l'état indifférencié, et de s'engager vers les lignées myéloïdes, lymphoïdes et érythrocytaires, rassemble une population hétérogène de progéniteurs [52]. Seule une faible proportion de ces cellules ($<0.08\%$ des cellules de la niche [53]) est capable d'assurer l'hématopoïèse à long terme, les autres cellules finissant par vieillir et épuiser leur potentiel "souche". Avec l'âge, la population hématopoïétique va diminuer, la moelle rouge va être remplacée par la moelle jaune [54], et l'individu connaîtra une diminution de ses capacités de repopulation hématopoïétiques (Figure 11).

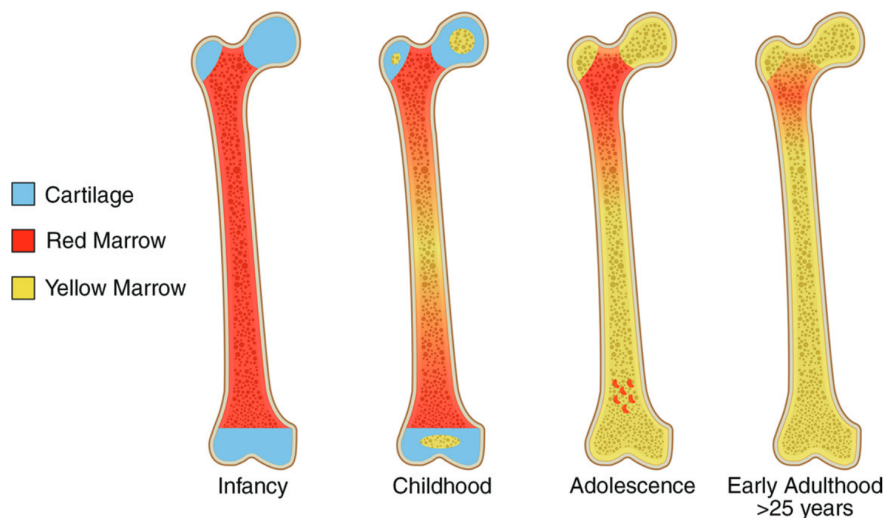


Figure 11: Distribution des moelles dites rouge et jaune selon l'âge des individus, Chan *et al.*[54]

La moelle "jaune" est principalement constituée de tissu adipeux, avec 90% d'adipocytes [55]. Ce tissu adipeux représente 70% du volume de moelle osseuse (et 10% de la masse graisseuse de l'organisme chez l'adulte sain [56]), et exerce un rôle paracrine de régulation de l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes, lignées impliquées dans le remodelage osseux.

Remodelage et homéostasie du tissu osseux

L'ensemble des acteurs listés ci-dessus interviennent tous dans la régulation structurelle et physiologique du tissu osseux. En plus du maintien des populations cellulaires, le tissu osseux doit également régulièrement renouveler sa matrice extracellulaire, notamment les cristaux d'hydroxyapatite. Au cours du temps [57], et sous les contraintes mécaniques dues à l'activité physique [58], le tissu minéralisé s'altère, et doit être remplacé. Ce processus adaptatif permanent est le remodelage osseux, et intervient tout au long de la vie de l'individu pour remplacer continuellement la matrice osseuse (Figure 12). Le remodelage

osseux s'organise par l'action concomittante de plusieurs acteurs cellulaires en unités multicellulaires basales, ou "BMU" (*Basic Multicellular Unit*) [59]. Le remodelage se décompose en une cascade d'étapes [60] impliquant quatre acteurs cellulaires majoritaires : les ostéocytes, les ostéoblastes (issus de progéniteurs mésenchymateux), les ostéoclastes et les macrophages (issus de progéniteurs hématopoïétiques).

Brièvement, les ostéocytes sont les cellules majoritaires peuplant la matrice minéralisée de l'os, formant un maillage à travers l'os cortical. Les ostéoblastes sont à l'origine de la synthèse de l'hydroxyapatite. Les ostéoclastes ont pour fonction la digestion enzymatique de l'hydroxyapatite et des fibres de collagène sur lesquelles elle s'est nucléée [61]. Les macrophages sont des cellules circulantes du système immunitaire et de la réponse inflammatoire [62].

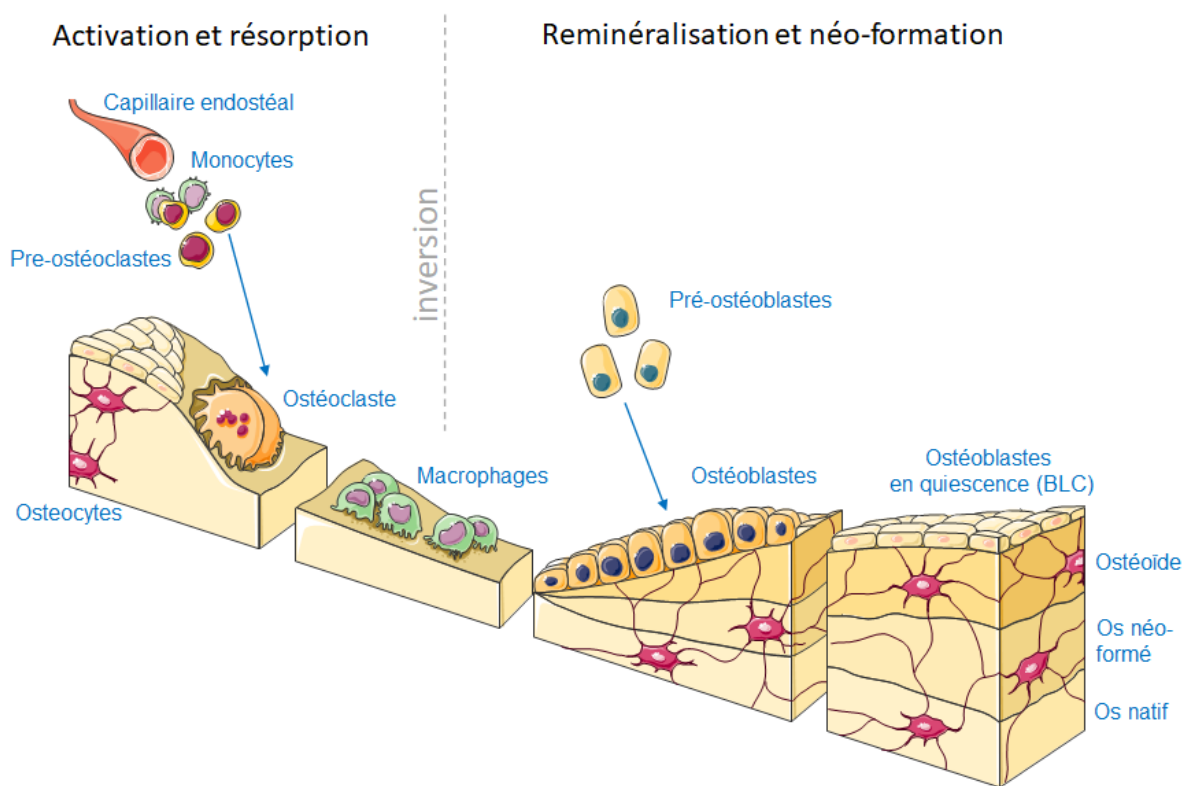


Figure 12: Les étapes du remodelage osseux

1. Activation

Une pluralité de signaux, mécaniques [63] ou hormonaux [64], peuvent être à l'origine de l'initiation du remodelage du tissu osseux. En effet, l'activité physique et les contraintes de charges qui y sont associées influencent la masse osseuse [65]. Une contrainte mécanique élevée induit une augmentation de la masse osseuse tandis qu'une faible contrainte (prenons l'exemple (très ordinaire) d'un séjour spatial durant lequel, par absence de gravité, les contraintes mécaniques imposées à l'os sont plus

faibles [66]) induit une perte de masse osseuse.

Ces changements de contraintes sont perçus par les ostéocytes [67], qui peuvent stimuler la minéralisation par la sécrétion de facteurs [68] ou provoquer l'activation du remodelage osseux [69] par le recrutement des ostéoclastes par sécrétion de la protéine RANKL (NF- κ B ligand).

L'activation des ostéoclastes peut être également médiée par action hormonale : c'est le cas pour l'hormone parathyroïdienne (PTH) [70], qui en cas d'hypocalcémie va provoquer l'augmentation de production de M-CSF (*macrophage-colony-stimulating factor*) et de RANKL, deux principales cytokines responsables de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes [71].

2. Résorption

Après activation dans la zone où les signaux (mécaniques ou hormonaux), ont été reçus, les ostéoclastes vont induire une digestion enzymatique de la matrice osseuse par sécrétion de vésicules acides lysosomales [72].

3. Inversion

La résorption de la matrice par les ostéoclastes laisse des vestiges acides de matrice collagénique, lesquels sont internalisés par des cellules mononuclées. Ce nettoyage de la zone de résorption induit un micro-environnement favorable au recrutement et à l'activation des ostéoblastes [73] avec la présence de PTH, et de peptides propices à l'adhésion des ostéoblastes.

4. Formation

Les ostéoblastes vont, sur la durée, reconstituer le tissu ostéoïde, et finir par entrer en quiescence à sa surface, tandis que ceux entravés dans le tissu néo-formé vont se différencier en ostéocytes [74].

Sous l'influence de facteurs tels que le vieillissement, le genre, le patrimoine génétique ou l'environnement, le remodelage est sujet à des dysfonctionnements qui contribuent à fragiliser le tissu osseux [75]. Lorsque le tissu osseux se rompt, le remodelage seul devient insuffisant, et différents mécanismes de réponse se mettent en place.

1.2 Régénération du tissu osseux

1.2.1 Les traumatismes et pathologies du tissu osseux

Le traumatisme osseux : la fracture

"La fracture (du latin *fractura*, de *frangere*, "briser") est la rupture d'un os ou d'un cartilage dur" telle que la définit le dictionnaire LAROUSSE [76].

Divers systèmes de classification de fracture existent pour répondre aux spécificités de chaque os et de chaque traumatisme. Dans un souci d'uniformité, une classification des fractures sous forme de nomenclature codée a été adoptée [77], qui catégorise deux aspects fondamentaux du traumatisme : 1-la localisation et 2-la morphologie de la fracture. Ainsi, plus de 1500 types de fractures peuvent être identifiés afin d'optimiser la prise en charge du patient et résoudre d'éventuels problèmes de communication entre intervenants médicaux.

De façon résumée, quatre grandes catégories de fractures —indépendamment de leur localisation— peuvent être distinguées. Une fracture peut être ouverte ou fermée, selon que l'os a traversé la peau pour se retrouver à l'air libre ou non, auxquelles s'ajoutent 2 sous catégories selon la présence ou l'absence de déplacement, si l'os se divise en plusieurs parties distinctes, dont l'une sort de l'alignement du tissu. A ces quatre catégories (ouverte, ouverte déplacée, fermée, fermée déplacée) peuvent s'ajouter différents motifs de fracture, qui détermineront la prise en charge thérapeutique personnalisée du patient [78] (Figure 13).

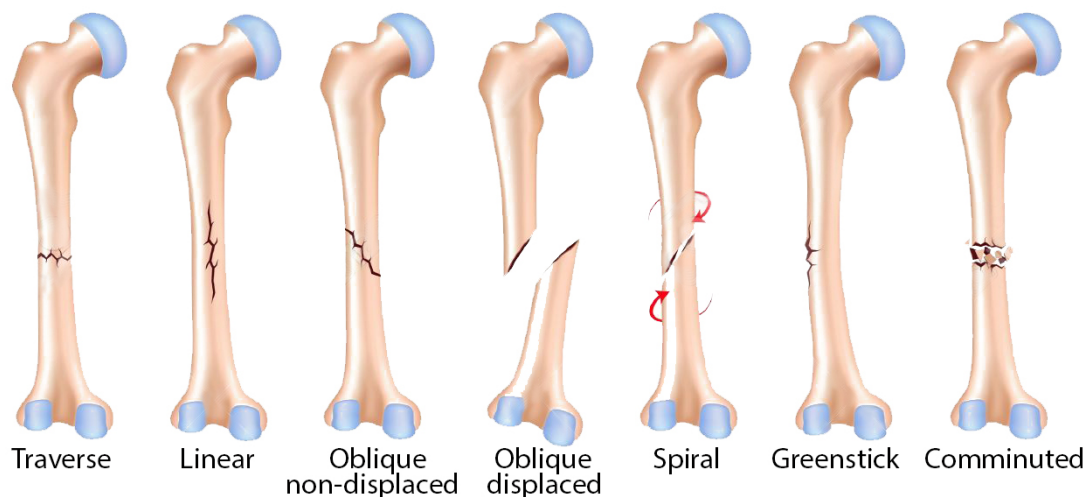


Figure 13: Les motifs de fracture, calqué sur McGuigan [78]

Sur les 30 dernières années, bien que le nombre absolu de fractures ait augmenté [79]

avec la croissance démographique [80, 81], une stabilisation [82] voire une diminution de leur incidence [83] ont été rapportées. Il semblerait que l'ensemble des progrès autour des soins et de la prise en charge des patients ait contribué à cette amélioration. Ainsi, 2 à 4% de la population mondiale sont affectés d'au moins une fracture chaque année, soit 160 à 320 millions d'individus, plaçant la prise en charge des traumatismes osseux comme un enjeu majeur de santé publique.

Influence de l'âge, du genre, du patrimoine génétique et de l'environnement

L'influence de l'âge et du genre sur l'incidence des fractures est un paramètre étudié depuis la seconde moitié du 20e siècle [84, 85]. Une étude épidémiologique réalisée sur plus de 15 000 individus à Edinbourg en 1998 [86] avec des résultats cohérents avec les études antérieures a mis en évidence pour la première fois deux tendances. Premièrement, chez les jeunes adultes l'incidence des fractures s'avérait près de 3 fois supérieure chez les hommes que chez les femmes tandis qu'au delà de 60ans, cette incidence était 2.3 fois inférieure à celle des femmes. En second lieu, l'analyse de l'incidence globale des fractures chez l'Homme fit ressortir trois profils associés au plus grand nombre de fractures : les jeunes adultes masculins, l'ensemble des patients les plus âgés, et les femmes à partir de 40 ans. Chez la population adulte, l'argument principal avancé pour justifier cet écart d'incidence est la corrélation avec une propension à adopter des comportements à risque physiques significativement plus prononcée chez les hommes[87]. Dans la population vieillissante, et plus particulièrement chez les femmes ménopausées (avec la diminution de la production d'oestrogènes et la perte de leur effet inhibiteur des ostéoclastes [88]), l'ostéoporose est un facteur observé, connu et décrit à l'origine des fractures [89]. Un certain nombre de pathologies d'origine génétique est également corrélé avec un défaut d'ostéogénèse [90], induisant une augmentation du risque de fracture et constitue un enjeu thérapeutique à part entière.

D'autres facteurs, au-delà de la physiologie intrinsèque à l'âge ou au genre des individus, ont été reportés comme aggravants dans le processus de réparation: le tabagisme [91], la consommation excessive d'alcool [92], un régime alimentaire appauvri en vitamines A et D [93]...

1.2.2 La réponse physiologique consécutive à la fracture

Dans les rares cas où la fracture est minime, et où l'os est fermement immobilisé, la réparation spontanée du tissu osseux peut s'effectuer par régénération des lamelles, sans

remodelage. Cependant, dans la grande majorité des cas de discontinuité du tissu osseux, la cascade de réparation physiologique de l'os est un processus qui suit quatre étapes clés [94] (Figure 14):

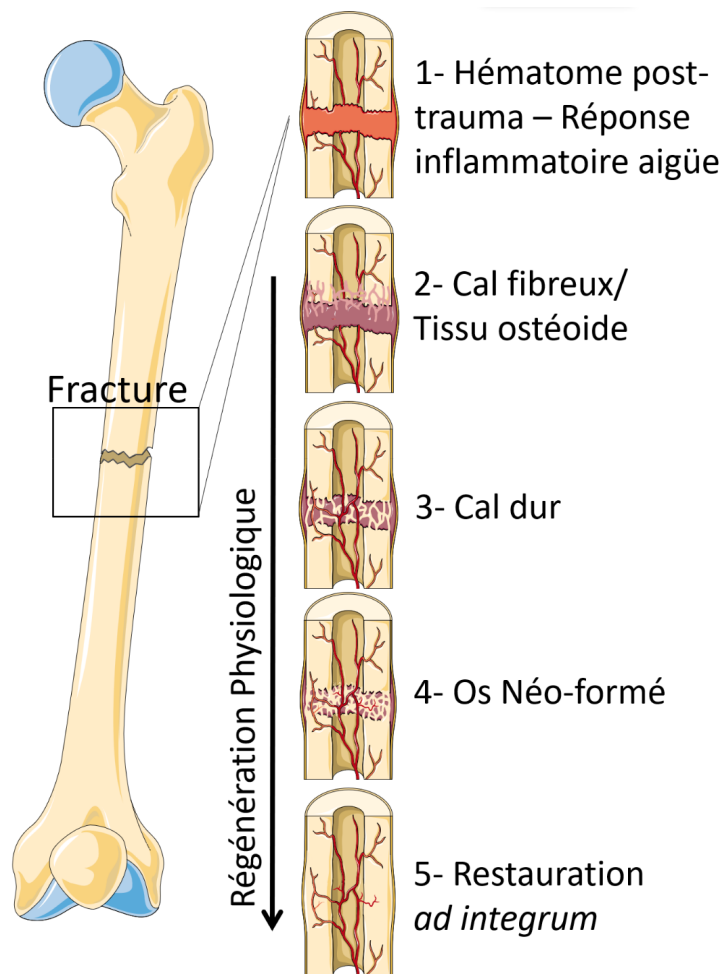


Figure 14: Étapes de réparation physiologique post-fracture

1. L'hématome post-traumatique et la réponse inflammatoire aiguë

La fracture du tissu osseux implique une cassure de la partie minéralisée, mais également celle du système vascularisé, plus fragile, qui le traverse. La rupture des vaisseaux entraîne une hémorragie locale, proportionnelle à l'ampleur du tissu endommagé. Ces bouleversements des organisations spatiales et physico-chimiques de l'environnement dus à un afflux sanguin et à une coagulation supraphysiologiques vont entraîner une réponse inflammatoire avec un pic d'intensité à 24h, qui s'étend jusqu'à 7 jours après la fracture. Aux limites du site du traumatisme, on retrouve les événements inflammatoires avec l'arrivée de cellules du système immunitaire : Neutrophiles (puis monocytes), Macrophages, Lymphocytes T associés à un profil cytokinique riche en molécules pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL (1-beta,6,8,10,12)).

Dans le même temps, les tissus limitrophes à la fracture sécrètent en grandes quantités des molécules pro-recrutrices des progéniteurs (SDF-1 pour recruter les MSC, VEGF pour stimuler l'angiogenèse) et cellules propices à la régénération du tissu endommagé (activation de la chondrogenèse et l'ostéoblastogenèse, inhibition des ostéoclastes). Au cœur du site du traumatisme, en l'absence de vascularisation, une hypoxie et perte de nutriments due à l'ischémie surviennent, et une modification du pH vient entraîner une acidose locale.

2. Le cal fibreux/ tissu ostéoïde

Cette nécrose induite par le traumatisme, et caractérisée par l'acidose aiguë ainsi qu'une hypoxie critique, provoque un recrutement important de progéniteurs chondrogéniques. Entre le 5^e et le 15^e jour, ces chondrocytes vont permettre la synthèse d'un tissu cartilagineux, légèrement résistant à la déformation, principalement constitué de collagène. Vers le 15^e jour, des chondrocytes hypertrophiques et des ostéoblastes matures commencent à libérer de l'ALP et précipitent le pyrophosphate circulant en déclenchant la cristallisation de l'hydroxyapatite, et des néovaisseaux bourgeonnent des bords vers le cœur du défaut [95].

3. Le cal dur

Entre le 20^e jour et 2 mois, les processus initiés pour former le tissu ostéoïde se maintiennent et se renforcent en direction du centre du défaut : la minéralisation des tissus progresse, tandis que le cal cartilagineux se résorbe. La vascularisation est abondante. A ce stade, des ostéoclastes sont recrutés et commencent à initier le processus de remodelage du tissu néo-formé.

4. L'os néo-formé

La formation du cal dur va progressivement permettre, durant le second mois, la restauration de l'intégrité tissulaire. L'os est capable de fournir une résistance mécanique à des efforts modérés. Le cal cartilagineux est complètement résorbé. La vascularisation atteint les besoins physiologiques.

Lorsque la restauration *ad integrum* est atteinte, l'ossification est maintenant complètement rétablie selon les normes physiologiques, avec un tissu néoformé et renforcé. Ce tissu est plus susceptible de résister aux contraintes mécaniques que le reste de l'os, avec une structure identique à celle précédant la lésion: la régénération est optimale.

1.2.3 Le défaut osseux critique

Dans certaines circonstances, lorsque la perte osseuse est trop importante ou liée à des facteurs de comorbidité, la réponse physiologique échoue dans son rôle de régénération osseuse. L'union des deux extrémités rompues n'est pas atteinte (non-union), et le terme de défaut osseux critique est alors employé en définition des cas où le tissu osseux ne pourra pas achever une restauration *ad integrum* sur une durée de convalescence standard.

L'incidence de non-union est estimée à 5% de l'ensemble des fractures [96], soit 8 à 16 millions de personnes touchées chaque année suivant l'incidence des fractures osseuses [79]. Il n'existe pas de consensus chez l'Homme sur la taille du défaut critique [97, 98], la criticité étant patient-dépendant (âge, comorbidité, circonstances du traumatisme, accès et qualité des premiers soins...).

L'enjeu thérapeutique majeur de la perte osseuse est donc de conserver un défaut osseux en dessous du seuil critique de non-union. Le diagnostic de criticité du défaut n'apparaissant qu'*a posteriori* de la fracture, les cliniciens doivent intervenir face à tout défaut osseux suspecté critique. Seront par exemple considérés à risque les patients âgés, ou souffrant de pathologies chroniques telle que diabète, maladies auto-immunes, les patients polytraumatisés...

1.2.4 Les stratégies de réparation

Les greffes

En se basant sur les projections précédemment décrites que 3% de la population est affectée par un traumatisme osseux, dont 5% d'entre eux nécessiteront une intervention spécifique, la demande en greffons osseux s'élèverait en France à plus de 100 000 par an.

Ce chiffre est relativement proche de celui fournit par un rapport annuel d'activité des Banques françaises de tissus de l'Agence de la Biomédecine (Figure 15), qui indique environ 72 000 greffons d'os (dont >99% de têtes fémorales) distribués pour 50 000 receveurs en 2020, à remettre en perspective des événements liés à l'épidémie du SARS-COV2, pour lesquels une large diminution du nombre de fractures a pu être rapporté [99].

Tableau T22 – Nombre de receveurs de greffe de tissus et unités tissus greffés par type de tissu en 2020

Type de tissu	Nombre de receveurs ayant bénéficié d'un greffon distribué	Greffons distribués à un greffeur en France
Cornées *(GLAC)	4392/ (NEFG) 3521*	4466/ (NATT) 3751*
Membranes amniotiques	3969	4839
Os Massif	282	299
Têtes fémorales	50020	71357
Peau (cm2)	173	457687.5
Valves cardiaques*	223	228
Artères	503	661
Veines	1747	2911
Tendons et ligaments	284	342
Os Autologue	218	220
Ménisques	25	25
Total	61836	543036

Source : Rapport annuel d'activité des banques de tissus françaises

*données issues de GLAC pour les cornées

Figure 15: Nombre de greffes effectuées en France en 2020, rapport de l'Agence de la Biomédecine

Les stratégies thérapeutiques basées sur la greffe de tissu osseux sont divisées en 3 catégories:

1. L'autogreffe

L'autogreffe constitue une stratégie théoriquement idéale, car reposant exclusivement sur l'utilisation de tissu osseux provenant d'un autre site du même organisme pour combler une perte osseuse [100]. D'un point de vue physiologique, le greffon respecte parfaitement l'homéostasie native du tissu endommagé. L'histocompatibilité est également garantie, permettant une réponse immunitaire appropriée, atout majeur de la prise de greffe. L'organe est immédiatement disponible, et ne nécessite pas de traitement particulier. Toutefois, il est rare de pouvoir bénéficier de suffisamment de tissu osseux disponible pour le comblement d'un défaut osseux. De plus, dans le cas de certains patients polytraumatisés, âgés, ou atteints par une pathologie de

l'os, l'autogreffe ne peut être envisagée afin de réduire les risques de comorbidité. Enfin, un risque de contamination lors de l'intervention chirurgicale existe malgré le respect des règles d'asepsie, le tissu transplanté n'étant pas stérilisé.

En France, entre 2016 et 2020, 1924 patients ont bénéficié d'une greffe de tissu osseux autologue, soit environ 385 par an (Source: Rapport annuel d'activité des Banques de tissus françaises).

2. L'allogreffe

Lorsqu'elle est possible, l'allogreffe présente les mêmes qualités que l'autogreffe : respect du tissu natif d'un point de vue composition, architecture, et physiologie. Cependant, l'histocompatibilité des tissus entre deux patients représente un frein majeur à l'utilisation des ces allogreffes. En effet, en dépit d'une préparation limitant au maximum l'immunogénicité par le site donneur [101, 102], les événements d'inflammation aiguë et de rejet [103, 104] mettent en péril la prise de greffe. En outre, dans le cadre de transplantation, les risques d'infection et de non consolidation dus à l'immunosuppression des patients sont accrus [105]. Enfin, le nombre d'organes disponibles et celui des patients avec un besoin de greffe sont inégaux, à l'instar de l'ensemble des besoin en transplantation d'organes [106].

En France, entre 2016 et 2020, 131 734 têtes de fémur ont ainsi été prélevées (26 350 par an) et 475 os (95 par an) dans le cadre d'allogreffe (Figure 16) (Source : Rapport annuel d'activité des Banques françaises de tissus), et un stock d'environ 40 000 têtes fémorales existe.

Tableau T16. Evolution de l'activité têtes fémorales depuis 2016

Activité Têtes fémorales	2016	2017	2018	2019	2020
Reçu	26458	26479	27551	29434	22870
Distribué	47106	56155	65999	79730	71357
Importé	126	433	498	1754	4130
Exporté	4947	7036	8190	11792	9679

Source : Rapport annuel d'activité des banques de tissus françaises

Figure T11 : Evolution de l'activité têtes fémorales depuis 2016 (issue du tableau T16)

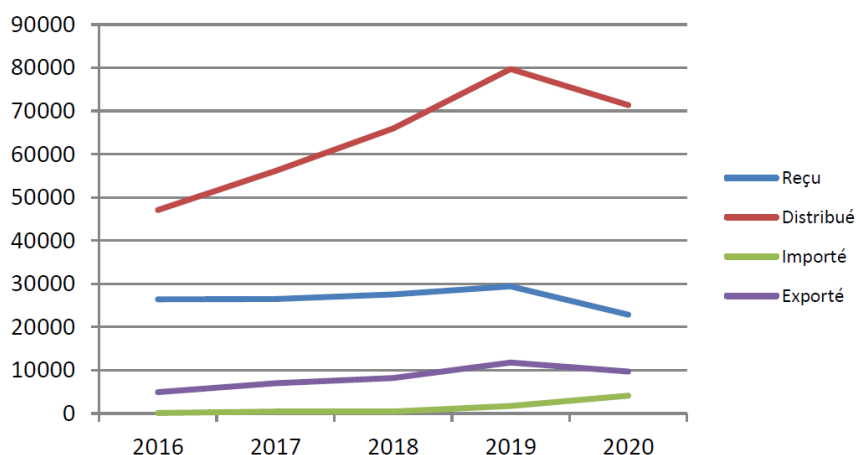


Figure 16: Évolution de l'activité de tissus en France entre 2016 et 2020, rapport de l'Agence de la Biomédecine

Par le nombre absolu d'interventions effectuées, l'allogreffe semble constituer une stratégie thérapeutique efficace face au nombre de défauts osseux. Cependant, cette solution ne parvient pas à répondre à la quantité grandissante de demandes, et le coût de revient du matériel est estimé entre 2 et 10 fois plus onéreux que le recours à un substitut [107].

3. La xénogreffe

La xénogreffe est la transplantation de matériel biologique entre deux espèces différentes [108, 109]. L'essor des outils de modification génétique récents [110] ont permis de s'affranchir des obstacles majeurs à la xénogreffe. Ces derniers sont similaires à ceux associés à l'allogreffe, avec des risques potentiels d'inflammation aiguë et de rejet des greffons par conflit d'histocompatibilité.

En France, la xénogreffe est assujettie à la Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 rela-

tive à la bioéthique. Aucune donnée n'est disponible sur le site de l'Agence de la Biomédecine au regard de l'utilisation clinique de tissus animaux au service de la médecine humaine dans le cadre de xénogreffe osseuse. Cependant des produits sont disponibles à l'exploitation commerciale [111, 112].

Face au déséquilibre substantiel de la balance offre/demande, aux limites d'histocompatibilité associées aux greffes, au coût de préparation et transport des greffons, et des contraintes de standardisation des procédures de fabrication/préparation des greffons, les substituts synthétiques ont bénéficié d'un essor de développement et de marché.

Les substituts de synthèse

Bien que la quête d'un matériau idéal de substitution osseuse ait connu un engouement récent, notamment grâce à l'émergence de nouvelles technologies, l'utilisation d'implants existe depuis plusieurs milliers d'années [113]. La découverte la plus datée à ce jour est l'insertion (au marteau) d'une plaque d'or pour combler le défaut osseux d'un crâne de chef d'une tribu pré-colombienne, il y a 6 500 ans [114]. Cependant, l'efficacité du recours à de telles stratégies étant évaluée à la survie de l'individu, les notions de performance de l'intégration du matériau à long-terme, sa dégradabilité, et le confort du patient sont longtemps demeurés des enjeux secondaires.

Les notions d'ostéoinduction, ostéoconduction, et ostéointégration [115] permettent de définir la performance de l'intégration du matériau par la capacité du matériau à 1/ se lier au tissu hôte (ostéointégration), 2/ constituer un support de colonisation matricielle minérale, vasculaire et/ou nerveuse (ostéoconduction), 3/ initier ou amplifier une réponse favorable à la reconstitution d'un tissu osseux (ostéoinduction).

Historiquement, les métaux, de par leur accessibilité, leur malléabilité et leur résistance aux contraintes mécaniques, ont constitué un matériau de substitution privilégié [116]. La première génération de matériaux de substitution, utilisée jusqu'aux années 1980, était dite "bio-inerte", avec pour seule fonction la réponse à un besoin mécanique, et conçue pour une intégration définitive. La seconde génération, à partir des années 1980, prit en considération l'aspect de l'interaction générée avec le tissu hôte au travers de modifications de la surface du matériau. Des méthodes de traitements physiques ou chimiques sont apparues afin de générer des topologies et des textures propices à une interface hôte-matériau biologiquement plus favorable, ainsi que l'application de matériaux bioactifs tels que l'hydroxyapatite pour optimiser l'ostéointégration et l'ostéoconduction. Avec la deuxième génération, la notion de résorbabilité du matériau entre pour la première fois en considération dans ce contexte d'alliage métallique pour la réparation osseuse. A

partir des années 2000, la troisième génération de biomatériaux permettra de tenir compte de l'aspect d'ostéoinduction, par l'ajout de facteurs de croissance destinés à être libérés au cours du temps, notamment dans des structures en titane bénéficiant d'une porosité satisfaisante. Ainsi, la majorité des matériaux métalliques possèdent une base d'acier inoxydable et/ou de titane, auxquels peuvent être alliés divers autres métaux tels que zinc, tantale, niobium, magnésium, strontium...

Toutefois, la majorité de ces implants n'étant pas dégradés par l'organisme, la persistance de matériel métallique (bien que non ferrugineux, et donc compatibles avec des dispositifs d'imagerie, par exemple) peut constituer un obstacle physiologique pour le remodelage du tissu natif.

Le développement des substituts de céramiques est analogue à celui des substituts de métaux, avec des céramiques initialement "inertes" —essentiellement composées de zircone ou d'alumine—, puis l'apparition de céramiques "bioactives" qui s'appuient notamment sur des bioverres, et des céramiques résorbables [117]. Dans un effort de biomimétisme, les composés conventionnellement rassemblés sous l'appellation "biocéramique" sont généralement élaborés sur une base de phosphate de calcium [118]. Identifiés dès la fin du XVIe siècle dans le tissu osseux [119], les phosphates de calcium physiologiques seront regroupés par Werner en 1786 sous l'appellation d'apatite, du grec *apatao* (frauder, tromper). Cette dénomination provient du fait que l'apatite a longtemps été confondue avec d'autres minéraux [120]. Bien que le terme d'apatite englobe un large spectre de minéraux de même structure cristallographique, il ne s'agit pas d'un seul minéral (Figure 17). L'hydroxyapatite physiologique constitue donc une forme d'apatite, mais pas la seule source potentielle de calcium et de phosphore utilisable pour la synthèse de substituts osseux.

Table 1
Existing calcium orthophosphates and their major properties [1,2].

Ca/P molar ratio	Compounds and their typical abbreviations	Chemical formula	Solubility at 25 °C, $-\log(K_s)$	Solubility at 25 °C, g/L	pH stability range in aqueous solutions at 25 °C
0.5	Monocalcium phosphate monohydrate (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.14	~18	0.0–2.0
0.5	Monocalcium phosphate anhydrous (MCPA or MCP)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.14	~17	^a
1.0	Dicalcium phosphate dihydrate (DCPD), mineral brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.59	~0.088	2.0–6.0
1.0	Dicalcium phosphate anhydrous (DCPA or DCP), mineral monetite	CaHPO_4	6.90	~0.048	^a
1.33	Octacalcium phosphate (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96.6	~0.0081	5.5–7.0
1.5	α -Tricalcium phosphate (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25.5	~0.0025	^b
1.5	β -Tricalcium phosphate (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28.9	~0.0005	^b
1.2–2.2	Amorphous calcium phosphates (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3\text{--}4.5$; 15–20% H_2O	^c	^c	~5–12 ^d
1.5–1.67	Calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA or Ca-def HA) ^e	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	~85	~0.0094	6.5–9.5
1.67	Hydroxyapatite (HA, HAp or OHAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116.8	~0.0003	9.5–12
1.67	Fluorapatite (FA or FAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	120.0	~0.0002	7–12
1.67	Oxyapatite (OA, OAp or OXA) ^f	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	~69	~0.087	^b
2.0	Tetracalcium phosphate (TTCP or TetCP), mineral hilgenstockite	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38–44	~0.0007	^b

^a Stable at temperatures above 100 °C.

^b These compounds cannot be precipitated from aqueous solutions.

^c Cannot be measured precisely. However, the following values were found: 25.7 ± 0.1 (pH = 7.40), 29.9 ± 0.1 (pH = 6.00), 32.7 ± 0.1 (pH = 5.28). The comparative extent of dissolution in acidic buffer is: ACP \gg α -TCP \gg β -TCP $>$ CDHA \gg HA $>$ FA.

^d Always metastable.

^e Occasionally, it is called "precipitated HA (PHA)".

^f Existence of OA remains questionable.

Figure 17: Variétés d'orthophosphates de calcium, Dorozhkin [120]

En effet, ces composés peuvent être utilisés afin d'apporter *in situ* un substitut dont le remodelage libère directement les éléments propices à la formation d'hydroxyapatite. C'est le cas du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), qui figure parmi les substituts osseux de synthèse les plus utilisés. Cependant, l'utilisation des biocéramiques est assujettie à deux défauts principaux : des propriétés de déformation à la contrainte moindres que celles des substituts métalliques, et une friabilité élevée.

Les bioverres et le Silicium

L'utilisation des bioverres pour la régénération osseuse, dont les prémices remontent aux années 1970, [121] a connu également un certain succès, le silicium étant un élément abondant et malléable. Les bioverres sont souvent des assemblages de Calcium, Sodium et Silicium (Si) (certains bioverres sont également conçus à base de Bore ou de Phosphore [122]), dont la stoechiométrie influence la capacité de liaison à l'os (Figure 18).

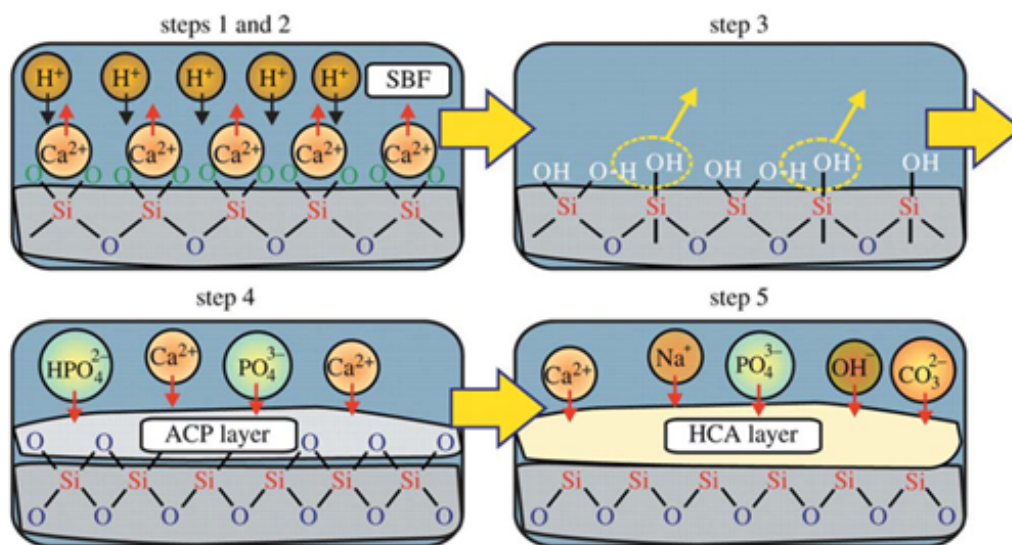
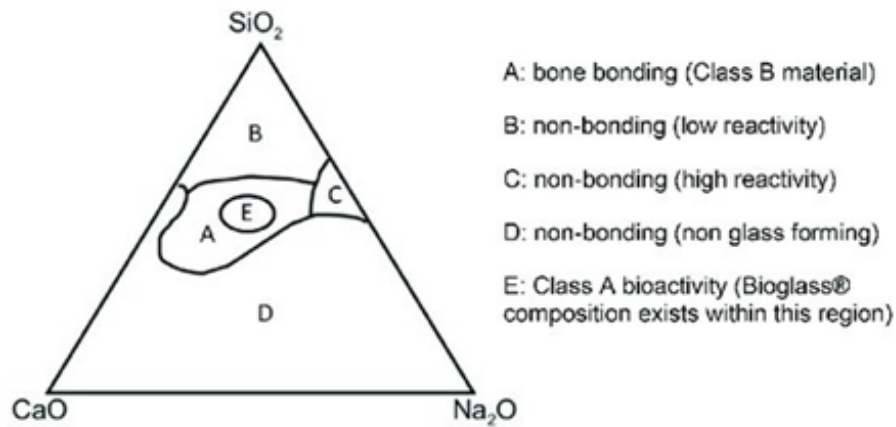


Figure 18: Composition des bioverres (haut), Crush *et al.* [123] et interaction physiologique avec l'os, Zhou *et al.* [124]

Un plus large développement est consacré en section 3.2 à la question de l'utilisation du silicium, composant conventionnel des bioverres. Brièvement, le dioxyde de silicium permet de générer une interface avec le calcium propice à la nucléation d'hydroxyapatite, permettant une ostéointégration efficace. Deuxième élément le plus abondant de la croûte terrestre (environ 28%) [125], de nombreuses études ont montré le rôle biologique important du Si chez l'Homme [126].

Au niveau des os, le Si est un élément essentiel à la formation des tissus : au début des années 1970, il a été démontré qu'une carence en Si était impliquée dans les désordres de la formation osseuse [127, 128]. Différents auteurs ont rapporté une meilleure bioactivité des biomatériaux grâce à la présence de Si, qui favorise la synthèse du collagène de type I, la différenciation ostéoblastique et la réparation osseuse [129–133]. Deux études ont

identifié des mécanismes d'action potentiels du silicium (Figure 19): Ha *et al.* [134] ont mis en évidence que des nanoparticules de silice étaient internalisées par endocytose par des progéniteurs ostéoblastiques murins (MC3T3-E1), entraînant une activation de l'autophagie menant à une augmentation de la différenciation ostéoblastique. Zhou *et al.* [135] ont rapporté que l'acide orthosilicique pouvait entrer dans cette même lignée cellulaire par l'action des protéines de transport membranaire NBC-1 et induire la synthèse de microARN 146a, avec pour conséquence la levée de l'inhibition de la différenciation ostéoblastique exercée par NF- κ B.

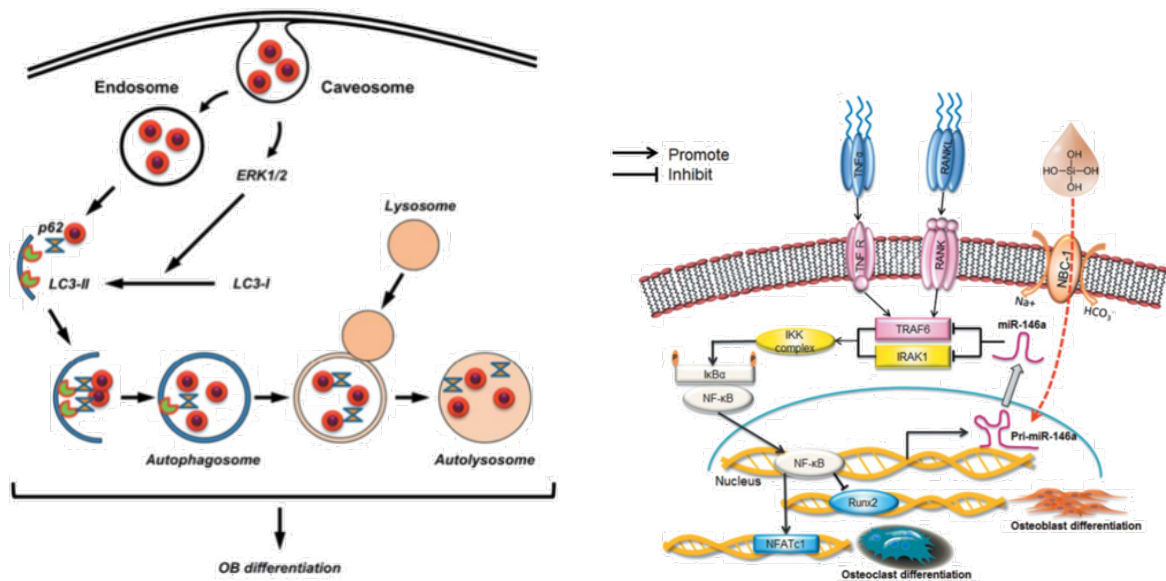


Figure 19: Mécanismes cellulaires d'action du Silicium par activation de l'autophagie décrite par Ha *et al.* [134] et par inhibition de NF- κ B rapportée par Zhou *et al.* [135]

L'ensemble de ces rapports soulignent donc l'intérêt et le fort potentiel de l'inclusion de Si dans les biomatériaux utilisés pour la régénération osseuse.

Le cahier des charges idéal

Au final, la diversité des substituts osseux permet de répondre à différents besoins, avec une performance variable [118] (Figure 20). Ces solutions alternatives aux greffes dépendent également de la spécificité du défaut osseux visé, et des contraintes qui lui sont associées.

Table 3 Osteoconductive scaffolds

Type	Graft	Osteoconduction	Osteoinduction	Osteogenesis	Advantages
Bone	Autograft	3	2	2	“Gold standard”
	Allograft	3	1	0	Availability in many forms
Biomaterials	DBM	1	2	0	Supplies osteoinductive BMPs, bone graft extender
	Collagen	2	0	0	Good as delivery vehicle system
Ceramics	TCP, hydroxyapatite	1	0	0	Biocompatible
	Calcium phosphate cement (CPC)	1	0	0	Some initial structural support
Composite grafts	β -TCP/BMA composite	3	2	2	Ample supply
	BMP/synthetic composite	—	3	—	Potentially limitless supply

Score: 0 (none) to 3 (excellent). DBM: demineralised bone matrix, TCP: tricalcium phosphate, BMA: bone marrow aspirate, BMP: bone morphogenetic protein.

Figure 20: Performance des substituts osseux comparativement à des stratégies de greffe, Giannoudis *et al.*[118]

La formulation d'un matériel performant résiderait ainsi davantage dans un substitut hybride fonctionnalisé, plutôt que dans l'application d'un matériau universel.

L'utilisation d'un substitut seul ne semblant pas suffisante, le matériel de greffe idéal pour guérir un défaut osseux de taille critique se situerait dans une fenêtre comprenant l'ensemble des bénéfices et avantages des greffes et des substituts de synthèse sans leur contrepartie négative, avec pour objectif le mimétisme physiologique du tissu osseux natif. L'objectif à atteindre serait ainsi la réparation du tissu osseux en utilisant l'organisme de l'hôte comme bioréacteur, afin de reproduire un état tissulaire d'origine, sans apport d'éléments persistant à long terme, qui ne seraient pas naturellement présents au sein du tissu natif. Ce concept de restauration des fonctions du tissu vivant par l'utilisation de matériel biologique existe sous le terme d'ingénierie tissulaire.

1.2.5 L'ingénierie tissulaire

"Tissue Engineering is the application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure-function relationships in normal and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, maintain, or improve tissue function" Skalak and Fox, 1988

L'ingénierie tissulaire est l'application des méthodes et principes de l'ingénierie et des sciences de la vie vers la compréhension fondamentale des relations structure-fonction dans les tissus sains et pathologiques des mammifères, et le développement de substituts biologiques afin de restaurer, maintenir ou améliorer la fonction tissulaire.

Historiquement définie par écrit pour la première fois en 1988 par Skalak et Fox [136] (cf encadré ci dessus), la notion d'ingénierie tissulaire définie ci-dessus sera complétée par Langer et Vacanti en 1993 [137] qui y apporteront 3 piliers fondamentaux (encadré ci dessous) : 1) des cellules 2) des substances promotrices de tissu 3) des matrices de support.

"Three general strategies have been adopted for the creation of new tissue: 1) Isolated cells or cell substitutes. This approach avoids the complications of surgery, allows replacement of only those cells that supply the needed function, and permits manipulation of cells before infusion. Its potential limitations include failure of the infused cells to maintain their function in the recipient, and immunological rejection. 2) Tissue-inducing substances. The success of this approach depends on the purification and large-scale production of appropriate signal molecules, such as growth factors, and, in many cases, the development of methods to deliver these molecules to their targets. 3) Cells placed on or within matrices" Langer et Vacanti

Trois grandes stratégies ont été adoptées pour la création de nouveau tissu: 1) des cellules isolées ou des substituts cellulaires. Cette approche évite les complications de chirurgie, permet le remplacement des seules cellules qui pourvoient la fonction nécessaire, et permet la manipulation des cellules avant injection. Ses limitations potentielles comprennent l'échec des cellules injectées à maintenir leur fonction au sein de leur réceptacle, et un rejet immunologique. 2) Des substances promotrices de tissu. La réussite de cette approche dépend de la purification et de la production à grande échelle de molécules de signal approprié, telles que des facteurs de croissance, et, en de nombreux cas, le développement de méthodes pour apporter ces molécules à leur cibles. 3) Des cellules placées sur ou au sein de matrices.

Cette définition demeure actuellement le consensus selon lequel l'ingénierie tissulaire repose sur la capacité d'un matériel biologique à induire, restaurer, maintenir ou améliorer une fonction tissulaire à l'aide d'éléments acellulaires de support, matriciels ou environnementaux. Dans le cas de l'os, l'objectif est de maintenir les rôles structurels, d'homéostasie ionique et d'hématopoïèse propres au tissu osseux.

1.2.6 Ingénierie du tissu osseux

L'homéostasie osseuse est atteinte par un équilibre dynamique de trois aspects interdépendants (Figure 21): une **organisation spatiale** cohérente avec une fonction mécanique, qui abrite un **environnement physico-chimique** dont les paramètres vont influencer les échanges entre **acteurs cellulaires**, lesquels pourront agir si nécessaire pour apporter des modifications et des ajustements. Cet équilibre physiologique est rompu lors d'évènements particuliers, dont le plus prévalent est la fracture, entraînant une perte de fonctionnalité du tissu.

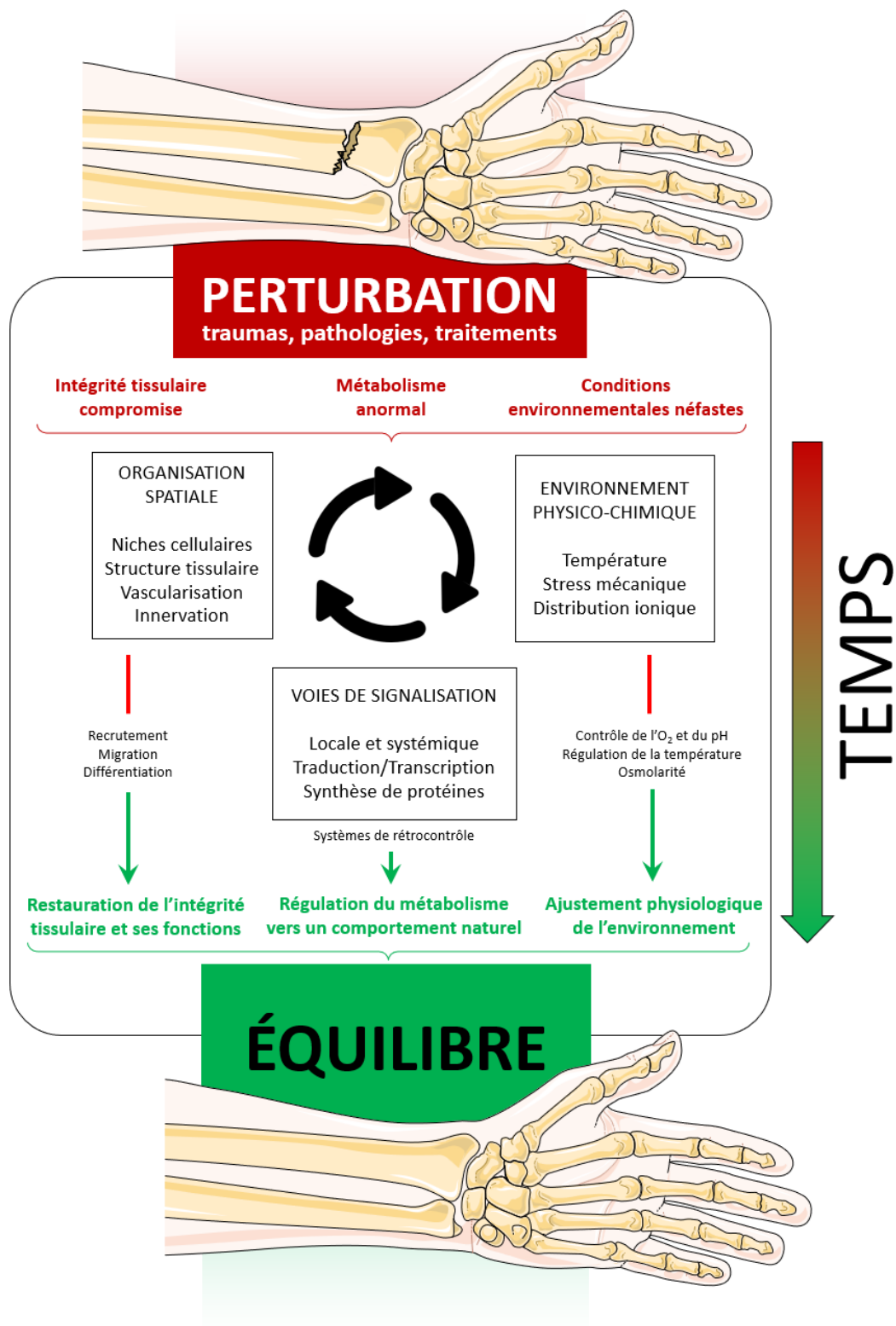


Figure 21: Schéma heuristique des acteurs et mécanismes majoritaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie osseuse

Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire osseuse a pour objectif de s'appuyer sur les connaissances fondamentales actuelles sur et autour de ces trois systèmes clés afin de restaurer cette homéostasie le plus rapidement et efficacement possible, notamment dans un contexte où l'organisme seul est dans l'incapacité d'apporter une réponse physiologique suffisante.

Les stratégies employées en ingénierie tissulaire impliquent une approche manufacturée selon un procédé répétable et reproductible pour fournir des produits fiables et fidèles au cahier des charges. Sallent *et al.*[112] mettent en lumière la faible quantité de substituts développés et les difficultés rencontrées pour atteindre les niveaux d'exigence réglementaires et compatibles avec une production de large échelle de produits thérapeutiques de substitution osseuse. L'un des moyens de répondre à cette démarche Qualité est le recours à des technologies de fabrication additive, dont l'utilisation dans un cadre professionnel est assujettie au respect de la norme ASTM52900-21 de l'Organisme International de Standardisation (ISO) (Figure 22).


7 Families of Additive Manufacturing						
According to ISO/ASTM52900-15 (formerly ASTM F2792)						
						
VAT PHOTO-POLYMERIZATION	POWDER BED FUSION (PBF)	BINDER JETTING	SHEET LAMINATION	MATERIAL JETTING	MATERIAL EXTRUSION	DIRECTED ENERGY DEPOSITION (DED)
<p>Alternative Names: SLA™ - Stereolithography Apparatus DLP™ - Digital Light Processing 3SP™ - Scan, Spin, and Selectively Photocure CLIP™ - Continuous Liquid Interface Production</p>	<p>Alternative Names: SLM™ - Selective Laser Melting (a.k.a. SLS™ - Selective Laser Sintering), DMLS™ - Direct Metal Laser Solidification (i.k.a. Sintering), EBM™ - Electron Beam Melting, MJF™ - Multi Jet Fusion, SLS™ - Selective Heat Sintering</p>	<p>Alternative Names: 3DP™ - 3D Printing (Binder Jetting)™ is available from ExOne, Voelkel, Desktop Metal's Production System™, and others) metal & ceramic require post-print sintering</p>	<p>Alternative Names: LOM - Laminated Object Manufacture SOL - Selective Deposition Lamination UAM - Ultrasonic Additive Manufacturing</p>	<p>Alternative Names: Polyjet™ SCF™ - Smooth Curvatures Printing MJM - Multi-Jet Modeling Project™</p>	<p>Alternative Names: FFF - Fused Filament Fabrication FDM™ - Fused Deposition Modeling APD™ - Augmented Polymer Deposition ADAM™ - Atomic Diffusion Additive Mfg™ BMD™ - Bonded Metal Deposition™</p>	<p>Alternative Names: LMD - Laser Metal Deposition LENS™ - Laser Engineered Net Shaping LMD - Direct Metal Deposition Laser cladding WAM - Wire-arc Additive Manufacturing</p>
<p>Description: A vat of liquid photopolymer resin is cured through selective exposure to light (via a laser or projector) which then initiates polymerization and converts the exposed areas to a solid part</p>	<p>Description: Powdered materials is selectively consolidated by melting it together using a heat source such as a laser or electron beam. The powder surrounding the consolidated part acts as support material for overhanging features.</p>	<p>Description: Liquid bonding agents are selectively applied onto thin layers of powdered material to build up parts layer by layer. The binders include organic and inorganic materials. Metal or ceramic powdered parts are typically fired in a furnace after they are printed.</p>	<p>Description: Sheets of material are stacked and laminated together to form an object. The lamination method can be adhesives or chemical (paper/plastics), ultrasonic welding, or brazing (metals). Unneeded regions are cut out layer by layer and removed after the object is built.</p>	<p>Description: Droplets of material are deposited layer by layer to make parts. Common varieties include jetting a photocurable resin and curing it with UV light, as well as jetting thermally molten materials that then solidify in ambient temperatures.</p>	<p>Description: Material is extruded through a nozzle or orifice in tracks or beads, which are then combined into multi-layer models. Common varieties include heated thermoplastic extrusion (similar to a hot glue gun) and syringe dispensing.</p>	<p>Description: Powder or wire is fed into a melt pool which has been generated on the surface of the part where it adheres to the underlying part or layers by using an energy source such as a laser or electron beam. This is essentially a form of automated build-up welding.</p>
<p>Strengths:</p> <ul style="list-style-type: none"> • High level of accuracy and complexity • Smooth surface finish • Accommodates large build areas 	<p>Strengths:</p> <ul style="list-style-type: none"> • High level of accuracy • Powder acts as support material • Wide range of materials 	<p>Strengths:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Allows for full color printing • High productivity • Uses a wide range of materials 	<p>Strengths:</p> <ul style="list-style-type: none"> • High volumetric build rates • Relatively low cost (non-metals) • Allows for combinations of metal foils, including embedding components 	<p>Strengths:</p> <ul style="list-style-type: none"> • High level of accuracy • Allows for full color parts • Enables multiple materials in a single part 	<p>Strengths:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inexpensive and economical • Allows for multiple colors • Can be used in an office environment • Parts have good structural properties 	<p>Strengths:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Not limited by direction or axis • Effective for repairs and adding features • Multiple materials in a single part • Highest single-point deposition rates
<p>Typical Materials UV-Curable Photopolymer Resins</p>	<p>Typical Materials Plastics, Metal and Ceramic Powders, and Sand</p>	<p>Typical Materials Powdered Plastic, Metal, Ceramics, Glass, and Sand.</p>	<p>Typical Materials Paper, Plastic Sheets, and Metal Foils/Tapes</p>	<p>Typical Materials Photopolymers, Polymers, Waxes</p>	<p>Typical Materials Thermoplastic Filaments and Pellets (FFF), Liquids, and Slurries (Syringe Types)</p>	<p>Typical Materials Metal Wire and Powder, with Ceramics</p>
<p>© 2015-21 Created and designed by Hybrid Manufacturing Technologies. For more information visit www.hybridmanutech.com</p>						

Figure 22: Fabrication additive - Les procédés d'impression 3D, d'après la norme ISO/ASTM52900-21 sur <https://hybridmanutech.com/resources/>, utilisé avec la permission de Hybrid Manufacturing Technologies

L'adaptation des concepts de fabrication additive dans le domaine du vivant a vu le jour à la fin du 20^e siècle, et a été répandue sous l'appellation générique *Biofabrication*.

1.3 Biofabrication en ingénierie tissulaire - 20 ans de rétrospective

1.3.1 Contexte historique et définitions

Apparu pour la première fois dans la littérature à propos de la biominéralisation de perles à partir d'un substrat inorganique en 1994 [138], puis présenté comme le "mariage entre biologie et microfabrication", le terme biofabrication a été redéfini en 2016 par une collaboration internationale de leaders de l'ingénierie tissulaire fédérée par Groll comme "la génération automatisée de produits biologiquement fonctionnels présentant une organisation structurale, à partir de cellules vivantes, molécules bioactives, biomatériaux, agrégats cellulaires tels que des micro-tissus, ou des constructions hybrides cellules-matériaux, par de la bio-impression ou du bio-assemblage et le processus subséquent de maturation des tissus." [139].

Dans ce consensus redéfini par Groll *et al.*, deux termes apparaissent: bio-assemblage et bio-impression (Figure 23).

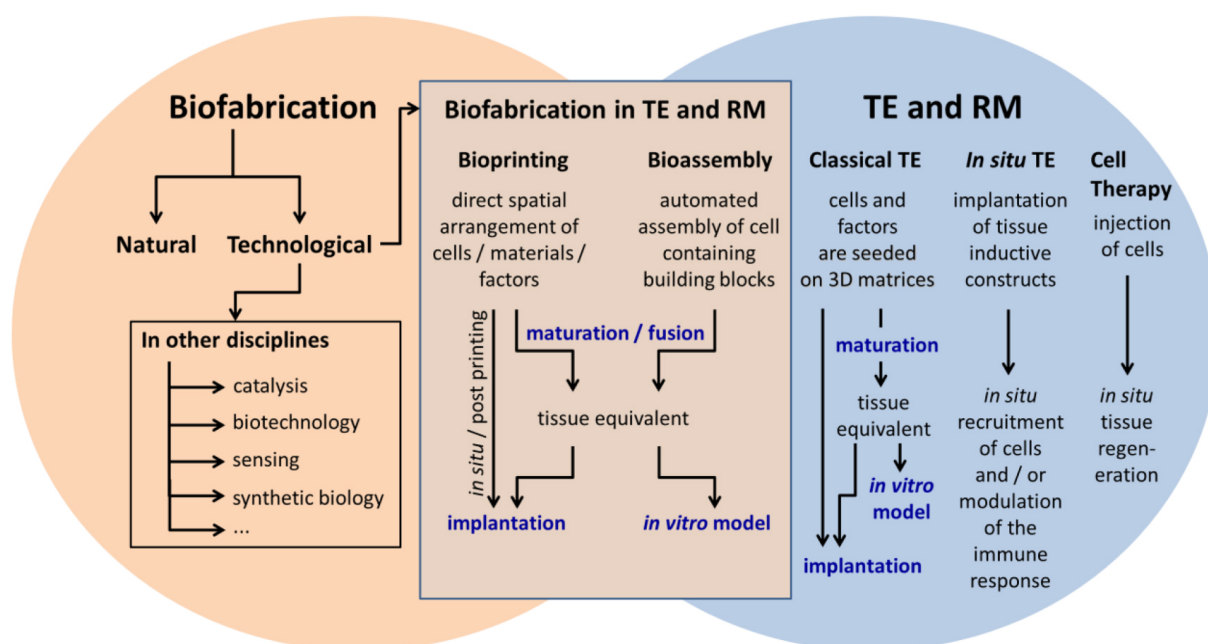


Figure 23: Place de la Biofabrication parmi l'ingénierie tissulaire, Groll *et al.* [139]

Le bio-assemblage défini par Groll *et al.* est "la fabrication de constructions hiérarchisées disposant d'une organisation 2D ou 3D pré-établie par l'assemblage automatisé d'unités de fabrication pré-formées contenant des cellules, générées *via* auto-organisation cellulaire ou par la confection de blocs de construction hybrides cellules-matériau, en

utilisant des technologies de soutien telles que des moules microfabriqués ou des dispositifs microfluidiques".

La bio-impression est définie par "l'utilisation de procédés de transferts assistés par ordinateur pour la création de motifs et l'assemblage de matériaux vivants et non vivants par une organisation 2D ou 3D pré-établie, dans le but de produire des structures bio-ingénierées au service de la médecine régénérative, de la pharmacocinétique, et de la recherche sur la biologie cellulaire fondamentale" [140].

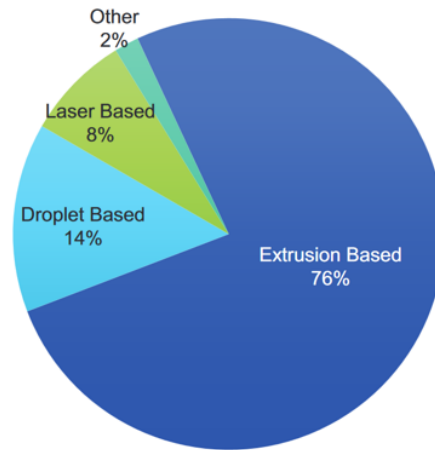
Dans un contexte de médecine régénérative, le bio-assemblage est donc une application en deux temps de produits d'ingénierie tissulaire, tandis que la bio-impression a pour vocation de créer un produit directement implantable.

1.3.2 La bio-impression

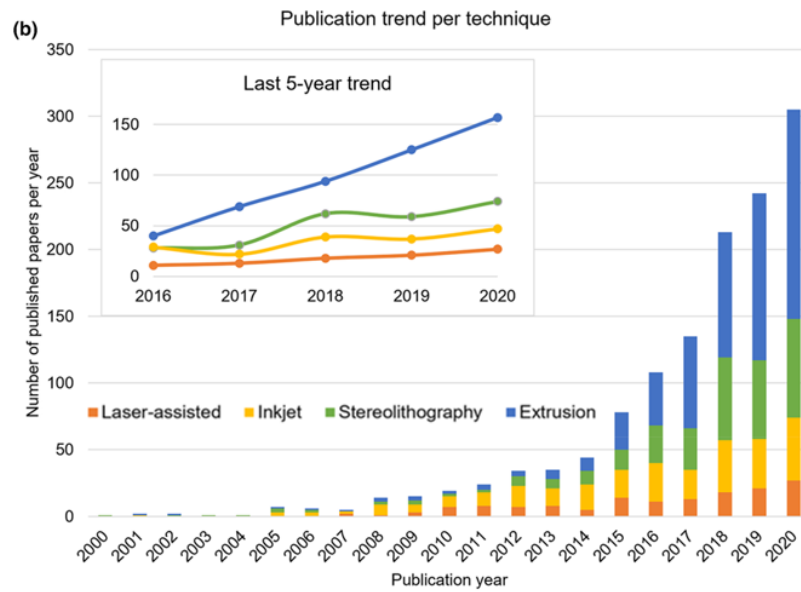
Analogue des procédés de fabrication additive, la bio-impression connaît un essor depuis le début des années 2000 [141]. Sur un aspect sémantique, le terme bio-impression fait écho au champ lexical de l'imprimerie : ainsi, la bio-impression réfère au procédé par lequel du matériel (encre ou bioencre) est transféré sur un support au moyen d'un appareil dédié (imprimante, station de bio-impression). Une nuance importante apportée par Groll *et al.* [142] existe entre les termes d'encre et de bioencre: "bioencre" s'utilise exclusivement s'il y a incorporation de cellules vivantes dans le matériel final avant le procédé d'impression, tandis que le terme "encre", ou "encre-matériau", correspond à l'élaboration de tout autre matériel à imprimer ne contenant pas de cellule vivante.

Récemment, un effort bibliographique rétrospectif [143–145] a vu le jour pour remettre en perspective les vingt dernières années de recherches consacrées au développement, à l'utilisation et à la recherche portant sur les technologies de bio-impression (Figure 24). Bien que les outils de récupération des articles ayant servi à réaliser ces études diffèrent (Santoni *et al.* ont rassemblé plus de 9000 articles avec un algorithme de recherche très ouvert : environ 60 mots-clés d'inclusion; Pedroza-González *et al.* ont utilisé un algorithme de recherche élaboré avec une dualité bioencre et impression 3D selon 50 mots-clés environ, pour un total de 393 articles; Ng *et al.* ont opté pour une recherche basée sur 3 mots-clés, pour un total de 351 articles), les tendances observées sont comparables.

Gonzalez *et. al*, 2021



Santoni *et. al*, 2021



Ng *et. al*, 2019

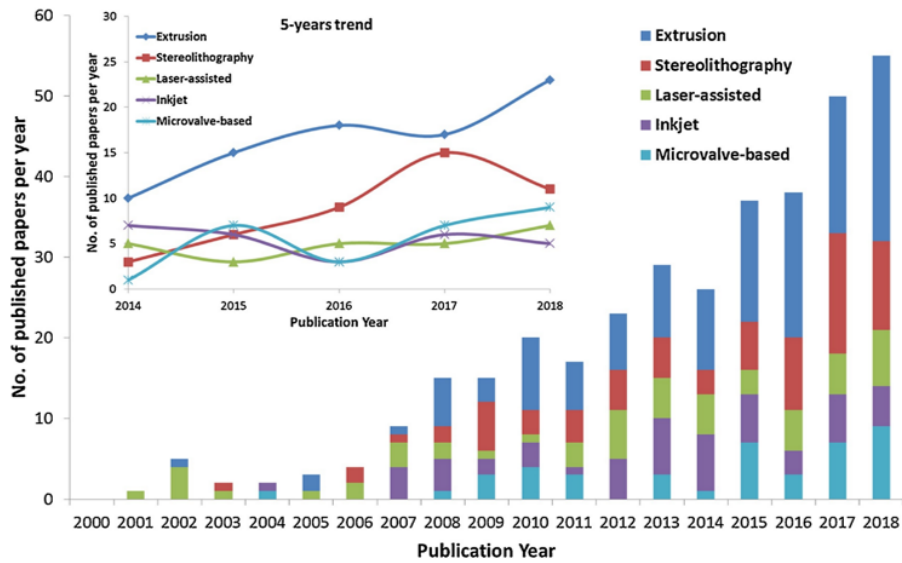


Figure 24: Répartition des technologies de bio-impression et tendances évolutives des 20 dernières années du nombre de publications associées à la bio-impression [143–145].

Dans chacune de ces revues, trois à quatre procédés de bio-impression semblent se démarquer du reste du parc technologique (Figure 25) : l'extrusion [146], la stéréolithographie [147] (qui n'apparaît pas chez Pedroza-González *et al.*, et dont il est possible qu'elle ait été associée à l'extrusion), le jet d'encre [148], et l'impression assistée par laser. L'extrusion trône à la première place, représentant la technologie de bio-impression la plus populaire, qui consiste au dépôt maîtrisé du matériau en le faisant passer à travers une buse, en contact avec le support receveur de l'impression. L'augmentation du nombre absolu de publications au cours du temps met en avant l'écart entre l'utilisation de l'extrusion et celle des autres technologies. Cependant, le ratio de publications associées à l'une ou l'autre des technologies présentées ne semble pas être modifié.

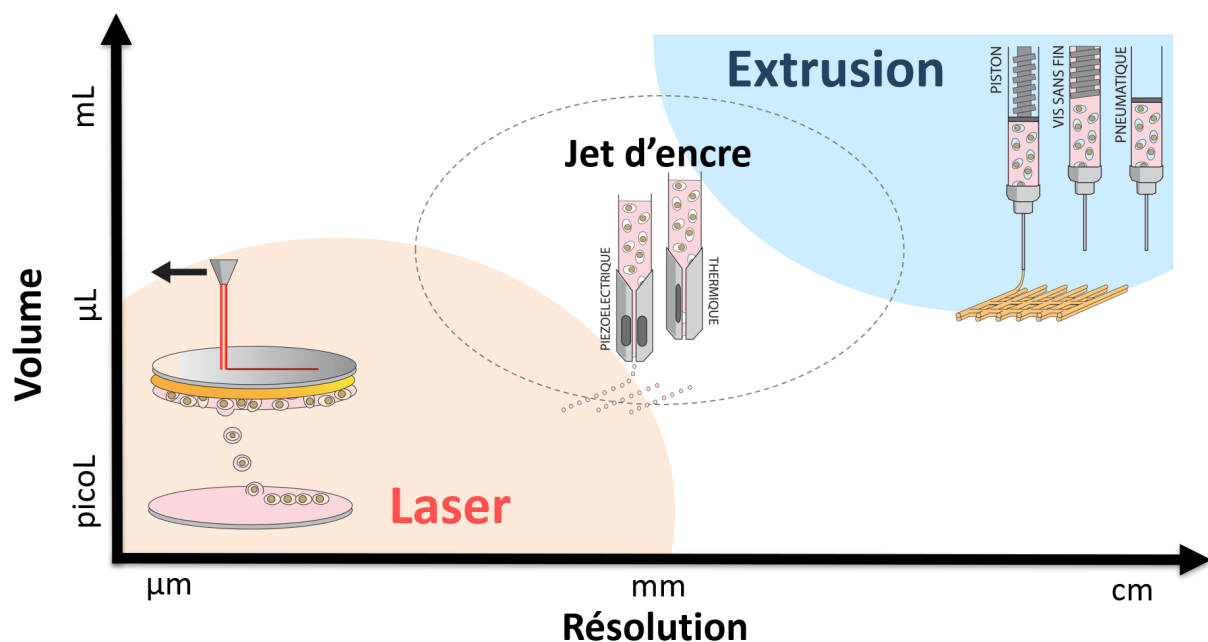


Figure 25: Répartition des principales technologies de bio-impression par la taille de résolution et le volume du matériel transféré, inspiré par De Oliveira et Catros *et al.*

Plusieurs arguments peuvent être avancés en faveur de l'utilisation préférentielle de l'extrusion (Figure 26): tout d'abord, la popularisation massive de l'impression 3D s'est grandement faite autour de l'extrusion, et l'accessibilité des appareils et consommables en termes de coûts donne un très net avantage à cette technologie. Ensuite, toujours grâce à la démocratisation de l'impression 3D, la formation requise et la manoeuvrabilité d'une imprimante à extrusion est également plus accessible, et un plateau de performance est atteint plus aisément qu'avec des technologies qui bénéficient d'un développement et d'expérience utilisateur moins poussés. Enfin, le net avantage de l'extrusion est sa capacité à pouvoir générer de larges structures, avec des stations modulables pour imprimer avec

des têtes multiples dont les diamètres vont généralement permettre l'extrusion de matériau par couche de plusieurs millimètres à quelques centaines de micromètres. Cependant l'extrusion possède un désavantage important : sa difficulté à imprimer des matériaux selon des couches fines. En effet, la réduction du diamètre de la buse d'impression augmente les contraintes d'imprimabilité, avec une plus forte contrainte de cisaillement, ce qui peut lourdement affecter la viabilité du matériel biologique qui subit ces forces [149]. Réduire la dimension de la buse augmente également sa fréquence d'obstruction lors de l'utilisation d'encres à caractère colloïdal, telles que des suspensions cellulaires, qui peuvent s'agréger et former des coagulums. L'impression de matériaux moins visqueux s'accompagnera également de plus grandes difficultés pour générer une structure en 3D stable et reproductible, avec des défauts d'homogénéité et des événements de fusion potentielle entre les couches successives d'impression. En résumé, dans un contexte d'ingénierie tissulaire, l'extrusion convient principalement à des projets d'impression de matériau à viscosité élevée, avec de grandes densités cellulaires (lorsque les cellules sont utilisées) pour compenser l'effet délétère du procédé, pour la biofabrication de structures larges (de quelques dizaines de millimètres à quelques dizaines de centimètres).

La stéréolithographie, qui nécessite un bain d'encre pour pouvoir générer des structures dont les couches sont successivement polymérisées par l'utilisation d'une source UV, est peu ou pas utilisée dans le cadre d'impression d'encre cellulaire, et convient davantage à la biofabrication de supports sur lesquels des cellules sontensemencées *a posteriori*, appartenant au sous-ensemble technologique du bio-assemblage plutôt qu'à celui de la bio-impression.

Pour des travaux demandant une résolution plus élevée, d'autres technologies de bio-impression se révèlent donc plus performantes : c'est le cas du jet d'encre qui, par l'utilisation de valves, permet l'éjection de gouttes d'encre au travers d'une buse, sans contact avec le support receveur. Cette technologie favorise l'impression de matériel selon une taille qui varie généralement de plusieurs centaines de micromètres à une centaine de micromètres. Sans la contrainte de contact avec le support, le jet d'encre offre la possibilité d'une impression beaucoup plus rapide, et grâce à sa plus haute résolution, consomme moins de matériel biologique par rapport à l'extrusion. Toutefois, le matériel imprimé par jet d'encre subit toujours des contraintes de cisaillement en passant au travers de la buse d'éjection, ce qui peut engendrer des pertes de viabilité pour du matériel cellulaire. La projection du matériel s'accompagne également de contraintes de comportement de l'encre à son entrée en contact avec le support, pour maîtriser la performance et la reproductibilité du procédé. Le jet d'encre trouve une place de prédilection dans la création de motifs et de

structures de moyenne dimension (de quelques millimètres jusqu'à quelques centimètres), et est généralement adopté dans le cadre de recherche *in vitro*.

La technologie d'impression assistée par laser, qui fera l'objet d'un développement ci-après en section 1.3, se positionne sur une résolution équivalente ou supérieure à celle du jet d'encre, avec du matériel imprimé à une résolution allant d'une centaine de micromètres à quelques dizaines de micromètres. Le laser permet le transfert de matériel sans contact, et sans buse, ce qui garantit une viabilité cellulaire optimale par l'absence de contraintes de cisaillement élevées. En théorie, l'utilisation du laser est plus avantageuse par rapport à celle du jet d'encre pour l'impression de cellules uniques, dans des volumes de l'ordre de la centaine de picolitres, ou dans le cadre de bio-impression avec une hiérarchisation spatiale très régulée. Cependant, l'emploi de volumes aussi faibles limite l'utilisation de l'impression laser à la formation de structures de petite taille, et dans un volume si faible qu'il faut davantage considérer l'impression laser comme de l'impression en 2D plutôt qu'en 3D. L'utilisation de l'impression laser trouve un intérêt dans la réalisation de travaux très fins, notamment en recherche fondamentale.

Bioprinting method	Inkjet 3D bioprinting	Microextrusion 3D bioprinting	Laser-assisted 3D bioprinting (LAD)	Stereolithography (SLA)
Description	Thermal, piezoelectric, or electromagnetic forces expel successive drops of bioink onto a substrate	Mechanical or pneumatic forces dispense bioink through a nozzle	Bioink and cells are suspended on the bottom of a ribbon and when vaporized by a laser pulse, are propelled to a receiving substrate	Use digital light to cure bioink in a layer by layer fashion
Advantages	High speed, availability, low cost	Ability to use high viscosity bioink and print high cell density	High degree of precision and resolution, ability to use high viscosity bioink and print high cell density	High degree of fabrication accuracy, and low printing time
Disadvantages	Lack of precision in droplet placement and size, need for low viscosity bioink	Distortion of cell structure	Time consuming, high cost	Use of high intensity UV light, lengthy post-processing, lack of compatible materials
Effect on cells	>85% cell viability ¹	As low as 40% viability ¹	>95% cell viability ¹	>90% cell viability ²
Cost	Low	Medium	High	Medium

Figure 26: Spécificités des principales technologie de bio-impression, Knowlton *et al.* [150]

Concernant les tissus cibles de l'utilisation des technologies de bio-impression (Figure 27), les tissu osseux, vasculaire et cartilagineux se disputent les 3 premières places, avec des proportions 2 à 4 fois plus importantes que le reste des tissus selon les revues de la littérature consultées [143, 144]. Les tissus osseux et cartilagineux, du fait de leur rigidité intrinsèque, constituent une cible de choix pour l'impression de matériaux de haute

viscosité. Compte tenu de la place prépondérante de l'extrusion parmi les technologies d'impression, un lien semble pouvoir être tissé entre l'impression de structures de grandes tailles et rigides, et les tissus qui coïncident avec ces spécificités.

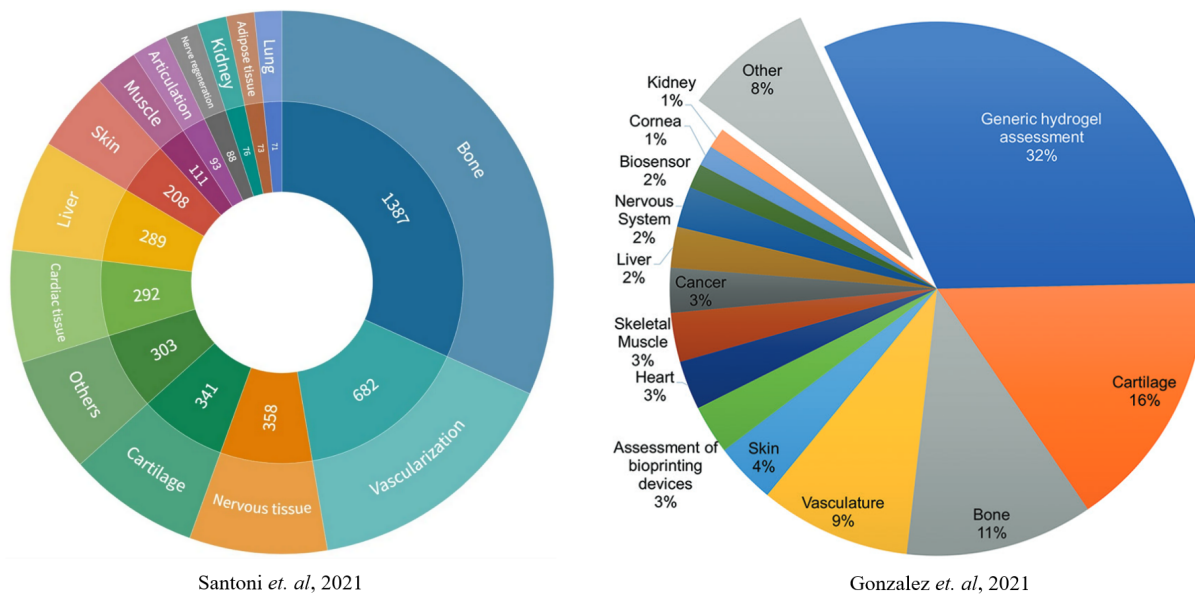


Figure 27: Tissus cibles de l'utilisation des technologies de bio-impression, par Santoni *et al.* et Gonzalez *et al.* [143, 144]

En effet, l'essor de l'impression 3D dans l'industrie s'étant fait principalement par l'extrusion de matériaux rigides, la pression de concurrence a fait naître du matériel plus performant, plus simple d'utilisation et moins coûteux. Lors du transfert de cette technologie vers les structures de recherche et développement de santé médicale, l'extrusion a donc d'emblée bénéficié d'une place privilégiée. Ainsi, bien que les principales causes de mortalité (cardiopathies ischémiques, accidents vasculaires cérébraux, bronchopneumopathie chronique obstructive, cancers et maladies neurodégénératives [151]) constituent les enjeux majeurs actuels de recherche et de santé publique, c'est le tissu squelettique qui, par pragmatisme d'application de l'extrusion, a intronisé la bio-impression et en constitue aujourd'hui une figure de proue. Le développement des autres technologies permettra probablement dans le futur de voir le ratio de publications sur les tissus osseux et cartilagineux diminuer au profit d'autres cibles potentielles.

Évoqué précédemment, le rôle crucial et universel de la vascularisation dans la biologie de l'organisme place également le tissu vasculaire au centre des intérêts de recherche.

Enfin, le développement d'hydrogels, tel que mis en évidence par Gonzalez *et al.*, est le reflet de l'effort collectif et continu, indépendamment du tissu cible, à identifier une formulation de (bio)encre optimale pour l'ingénierie tissulaire.

1.3.3 Scaffolds, encres et cellules des bioencres

Les *scaffolds* et hydrogels

La notion de *scaffold*, traduite par "échafaudage", regroupe l'ensemble des structures élaborées pour servir de support ou de véhicule aux éléments biologiques, cellulaires ou non, à placer *in situ*. La majorité de ces structures sont destinées à être implantées, cependant certains matériaux de bio-assemblage dits "sacrificiels" existent et permettent de servir de tuteurs au produit final, et sont résorbés ou retirés avant l'implantation.

La formulation de l'encre qui constitue le *scaffold* est influencée par différents aspects. En premier lieu, c'est le tissu cible ou un objectif fixé de propriétés physico-chimiques à respecter en termes de volume, de propriétés mécaniques et d'interactions chimiques qui va conditionner le cahier des charges à respecter. Ce cahier des charges, en fonction du choix des composants de l'encre, va orienter le choix de la technologie de bio-impression à employer. Enfin, l'adoption d'une technologie d'impression spécifique déterminera la formulation finale de l'encre pour en respecter la fenêtre d'imprimabilité, dont les limites sont dépendantes de la rhéologie du matériau (plasticité, viscosité). Ainsi, pour que le matériau final puisse disposer de propriétés conformes au cahier des charges établi, il faut tenir compte du procédé d'impression par lequel sa structure sera conçue (Figure 28).

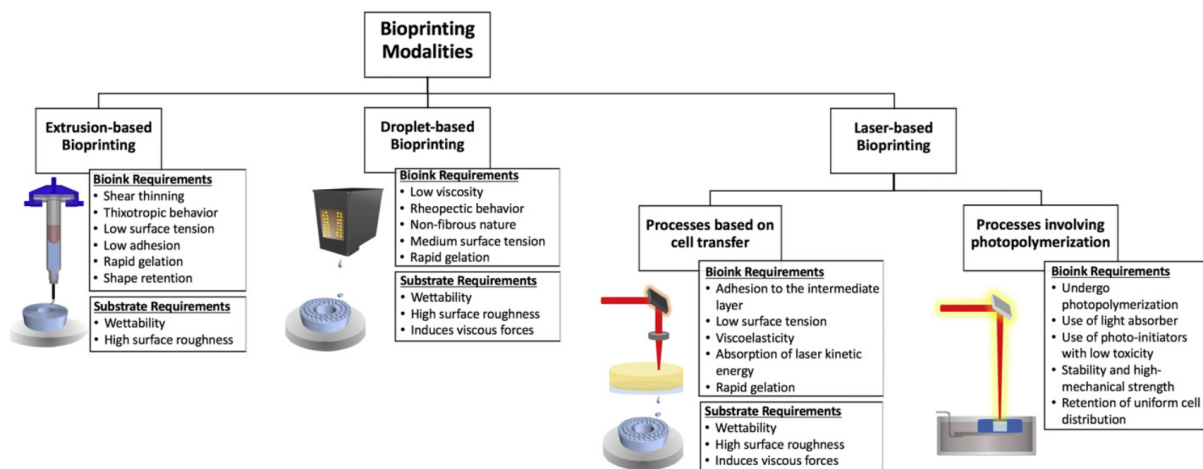


Figure 28: Techniques de bio-impression et pré-réquis des bioencres, Cally *et al.* [152]

Par exemple, pour la fabrication d'un substitut osseux de nature biocéramique, il est fréquent de recourir à de l'extrusion [153, 154]. Pour atteindre le seuil d'imprimabilité relatif à ce procédé, la poudre initiale est généralement mélangée à un solvant organique tel qu'un alcool afin d'obtenir une pâte céramique extrudable. Après extrusion, le matériau subit un frittage —procédé d'élévation de température qui permet de faire évaporer le solvant et de souder les particules— qui lui conférera ses propriétés finales

avant implantation. Parmi les points critiques, la température et la durée de frittage vont largement influencer les propriétés physiques du matériau (porosité, élasticité, etc.), lesquelles seront elles-même dépendantes de la formulation de la pâte pour en permettre l'extrudabilité. Cet exemple illustre la nécessité de tenir compte de chaque procédé et de ses caractéristiques intrinsèques pour garantir l'obtention d'un matériau fidèle au cahier des charges élaboré. Dans cet exemple, l'encre-matériau n'inclue pas de cellules car le procédé de fabrication du *scaffold* est hautement délétère (présence de solvant toxique, frittage à température létale), mais le produit fini est biocompatible, et peut être imprégné d'une suspension cellulaire et/ou enrichi en principes actifs lors d'une étape d'ensemencement ou de trempage.

Dans les cas où le matériau imprimé est destiné à intégrer nativement des cellules, la formulation d'une bioencre requiert de faire correspondre les besoins physiologiques des cellules avec les limites d'imprimabilité [155]. Dans la plupart des cas, les formulations de bioencre ont une faible viscosité pour permettre leur imprimabilité, et sont pourvues d'un additif conçu pour en permettre la réticulation —la formation d'un ou de plusieurs réseaux tridimensionnels, par voie chimique ou physique— sous l'action d'un signal spécifique. Le terme d'hydrogel [156] est souvent utilisé pour désigner les bioencres réticulées, du fait de leur contenu élevé en eau. L'utilisation de ces hydrogels a pour but principal d'imiter une matrice extracellulaire de faible rigidité comparé au tissu osseux [157]. Ainsi, bien que les hydrogels soient très efficaces au regard de l'interaction biologique avec les cellules, leurs propriétés mécaniques sont très faibles, et ils ne permettent pas la récupération rapide de la fonction de support ou de mobilité du membre concerné. Les hydrogels destinés à l'ingénierie tissulaire osseuse sont nombreux à être développés sous une forme injectable [158–160]. Il est ainsi possible de les associer à des procédés de biofabrication, mais leur compatibilité avec des stratégies de bio-impression dépendent du facteur de réticulation employé: signal photonique, température, réaction chimique...

L'encapsulation de cellules au coeur des hydrogels [161] exerce également une influence sur la composition finale du gel, ainsi que la possibilité de sa dégradation. Toutes les cellules ne peuvent pas être encapsulées, et le choix des éléments cellulaires à impliquer dans la formulation de la bioencre dépend de la stratégie de régénération retenue.

Les cellules de l'ingénierie tissulaire osseuse

Dans le cas du tissu osseux, pour favoriser la minéralisation d'un tissu néo-formé, l'ingénierie tissulaire repose sur deux leviers stratégiques : 1) apporter des cellules compétentes pour minéraliser ou reconstituer la partie minérale du tissu cible en implantant des cellules cultivées *ex vivo* ou en stimulant le recrutement des cellules hôtes et 2) induire la minéralisation du tissu de façon à activer directement les mécanismes de signalisation

du phénotype de minéralisation, ou de manière indirecte en exerçant un contrôle sur les effecteurs et messagers secondaires de ces mécanismes.

Les cellules les plus favorables à la reconstruction d'un tissu minéralisé sont, de par leur phénotype, les ostéoblastes. Bien que des lignées immortalisées avec un phénotype équivalent existent [162], l'isolement d'une quantité suffisante de ces cellules à partir de tissu sain pour des besoins d'ingénierie tissulaire serait associé à un rendement extrêmement préjudiciable devant la difficulté et le coût du procédé. De plus, l'expansion et le maintien *in vitro* de ces cellules est également techniquement difficile et coûteux, et requiert un temps de préparation désavantageux lorsque l'ingénierie tissulaire a pour objectif une quasi-immédiate disponibilité de produits. Comparativement, l'extraction et le maintien *ex vivo* de cellules souches et de progéniteurs présentant un potentiel ostéogénique à partir de stroma mésenchymateux est plus simple. Comme évoqué précédemment, la source de MSCs la plus répandue depuis leur découverte est la moelle osseuse [163]. En clinique, la récupération de ces cellules est un processus qui s'effectue généralement de manière opportuniste dans le cadre de greffes de cellules souches hématopoïétiques. Dans le but de greffer les CSH de la moelle d'un donneur à un patient immunodéprimé receveur, jusqu'à 500 ml de moelle sont prélevés au niveau de la crête iliaque. Certains résidus d'os et de tissu adipeux sont retenus dans la filtration de la moelle. Avec le consentement du donneur, ces déchets opératoires peuvent être valorisés pour en extraire des populations de progéniteurs mésenchymateux à des fins de recherche.

En dépit du caractère universel de l'utilisation des MSCs dérivées de la moelle osseuse (hBM MSCs), il existe des populations de cellules avec des capacités phénotypiques équivalentes dans des tissus plus accessibles. Par exemple, le tissu adipeux est une source riche en cellules souches. Cependant, ces cellules ont été identifiées comme moins compétentes d'un point de vue ostéogénique que les hBM MSCs [164]. En réalité, la plupart des tissus adultes contiennent des cellules présentant des phénotypes comparables aux MSCs [165], respectant la nomenclature minimale définie par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire [166] : la capacité d'adhésion au plastique (pour la culture *in vitro*), l'expression d'un profil phénotypique minimal (présence des marqueurs membranaires CD105, CD73, CD90; absence des marqueurs CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alpha ou CD19, HLA-DR), et la capacité à se différencier en chondroblastes, adipocytes, et ostéoblastes.

Parmi les tissus dans lesquels ont été retrouvées des MSCs, les tissus dentaires, et notamment ceux des dents de sagesse, ont particulièrement retenu l'attention de la Recherche à partir des années 2000 pour trois principales raisons. La première, très pragmatique, est que ces tissus constituent des sources très accessibles de produits cellulaires : en effet, l'avulsion des dents de sagesse est une pratique chirurgicale très courante, et les tissus retirés sont considérés comme des déchets opératoires. Ensuite,

l'intervention chirurgicale est associée à un risque très faible pour la santé du patient, avec une pénibilité réduite, comparativement à l'isolement de MSCs obtenues par prélèvement de moelle osseuse, plus invasif et nécessitant un cadre opératoire plus important. Enfin, les dents de sagesse font partie des derniers tissus à développer leur maturité lors du passage de l'individu à l'âge adulte. Cette latence de développement préserve l'immaturité du tissu et permet une grande pureté de ses cellules [167], qui restent pendant une longue période isolées dans une niche spécifique.

Plusieurs sous-populations de cellules souches d'origine dentaire et péri-dentaire ont été identifiées selon leur tissu d'appartenance (Table 1 et Figure 29):

Acronyme	Cellules et sources	Année	Ref
DPSCs	Dental pulp stem cells	2000	[168]
SHED	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth	2003	[169]
PDLSCs	Stem cells from human periodontal ligament	2004	[170]
PCs/DFSCs	Precursor cells from human dental follicle of wisdom teeth	2005	[171]
ABMSCs	BMSCs from human alveolar/jaw bone	2005	[172]
TGPCs	Tooth germs progenitors cells from third molar	2008	[173]
SCAPs	Stem Cells from Apical Papillas	2008	[174]
GMSCs	Gingiva-derived mesenchymal stem cells	2009	[175]

Table 1.1: Populations et origines des cellules souches dérivées de tissus dentaires

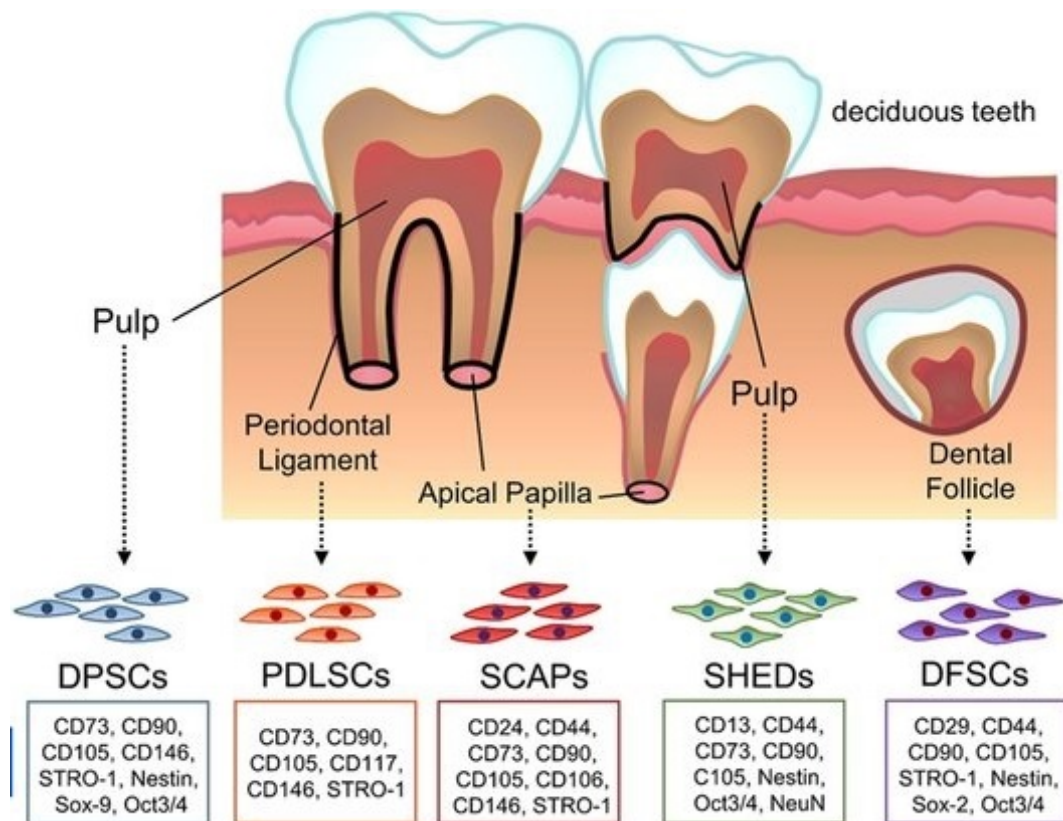


Figure 29: Sources, identités et phénotypes des cellules souches dérivées des tissus dentaires d'après Kong *et al.* [176]

L'ensemble de ces cellules souches ont été décrites comme sources potentielles pour la régénération du tissu osseux [176–178] et plusieurs études comparatives ont été menées dans l'optique d'identifier les populations présentant les plus grandes capacités régénératrices.

Dans l'objectif de régénérer du tissu osseux, les travaux présentés ci-après ont pour source cellulaire des Cellules Souches dérivées de la Papille Apicale (SCAPs), une sous-population identifiée dans les papilles apicales de dents de sagesse, capable d'induire une minéralisation de leur environnement.

Les SCAPs, cellules souches de la papille apicale

Les SCAPs ont été comparées aux DPSCs (cellules souches de la pulpe dentaire) [179] et aux PDLSCs (cellules souches du ligament parodontal) [180], deux populations rapportées comme exprimant, parmi les cellules souches dérivées des tissus dentaires, les phénotypes ostéogéniques et prolifératoires les plus avantageux [181]. Ces études comparatives *in vitro* ont mis en exergue que les SCAPs possédaient des potentiels ostéogénique et d'auto-renouvellement supérieurs à ceux des autres cellules souches dentaires.

Les SCAPs ont également été comparées aux hBMMSCs. Les MSCs, découvertes

en 1976 [163] et largement décrites ensuite [166], constituent le *gold standard* des lignées multipotentes à partir desquelles la différenciation ostéogénique est possible [182].

Des profils d'expression fondamentaux très similaires ont été retrouvés chez les SCAPs et les MSCs [183, 184]. De plus, les SCAPs présentent des capacités de différenciation ostéogénique *a minima* comparables [185], si ce n'est supérieures [174, 186, 187] à celles des MSCs.

Les SCAPs ont aussi été rapportées comme capables d'induire une réponse ostéogénique plus performante en présence de protéines bactériennes [188], mettant en avant l'hypothèse d'une plus grande résistance de cette population face aux infections [186].

Par leur facilité de prélèvement, leur disponibilité et leur potentiel ostéogénique, les SCAPs constituent donc un modèle cellulaire privilégié pour l'ingénierie tissulaire osseuse et ont été utilisées comme matériel cellulaire dans le cadre de ces travaux de thèse.

1.4 La Bio-impression Assistée par Laser

1.4.1 Origine historique du LASER

La technologie du LASER « Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation » (amplification de lumière par émission stimulée de rayonnement) [189] est dérivée du MASER (Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation) créé par Townes [190], dont le fonctionnement exploite le principe d'émission stimulée de rayonnement théorisé par A. Einstein [191].

En 1916, Einstein avança l'hypothèse suivante (Figure 30) : un atome à l'état excité, sous l'incidence d'un photon, est capable de se désexciter et d'émettre un photon de même polarisation, dans la même direction de propagation et la même longueur d'onde que le photon incident. Toutefois, cette émission stimulée de photon n'est possible que dans un contexte particulier, impossible à démontrer expérimentalement avec les moyens technologiques de l'époque.

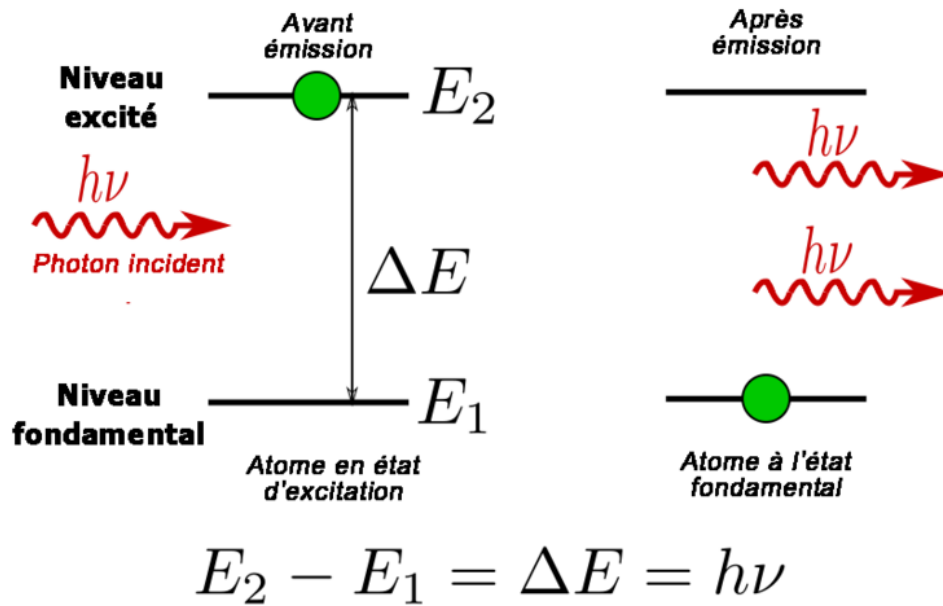


Figure 30: Principe de fonctionnement de l'émission stimulée de rayonnement.

Cette théorie d'une émission de rayonnement par stimulation a ainsi été exploitée par Townes dans les années 1950, jusqu'à aboutir à la création du MASER. L'ensemble de ces travaux lui vaudront par ailleurs l'obtention du prix Nobel de physique en 1964. Cependant, c'est Maiman *et al.* [192] qui, largement influencés par les travaux de Townes, créèrent au début des années 1960 le premier montage expérimental de LASER « Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation » (amplification de lumière par émission stimulée de rayonnement)[189], et qui popularisèrent cette technologie.

La création d'un faisceau laser repose ainsi sur l'exploitation de ce principe d'émission stimulée, et nécessite trois éléments: une source d'énergie, un milieu d'amplification, et une cavité optique.

La source d'énergie provoque l'excitation des atomes constituant le milieu dit d'amplification. Une partie de ces atomes, retournant à leur état initial, va émettre des photons. Le rayonnement émis est alors piégé dans une boucle de miroirs pour être constamment redirigé vers le milieu amplificateur. L'apport de la source d'énergie va permettre de maintenir la population des atomes à l'état excité, les plaçant en condition favorable d'émission stimulée de rayonnement. L'amplification est ainsi auto-stimulée par le rayonnement émis par la population des atomes maintenus à l'état excité : c'est le principe du système de pompage en cavité optique [193]. Passé un certain seuil, le rayonnement généré par la population d'atomes du milieu d'amplification dépasse les pertes de photons qui franchissent le miroir partiellement transparent en sortie du milieu amplificateur, formant un faisceau de photons: le laser (Figure 31).

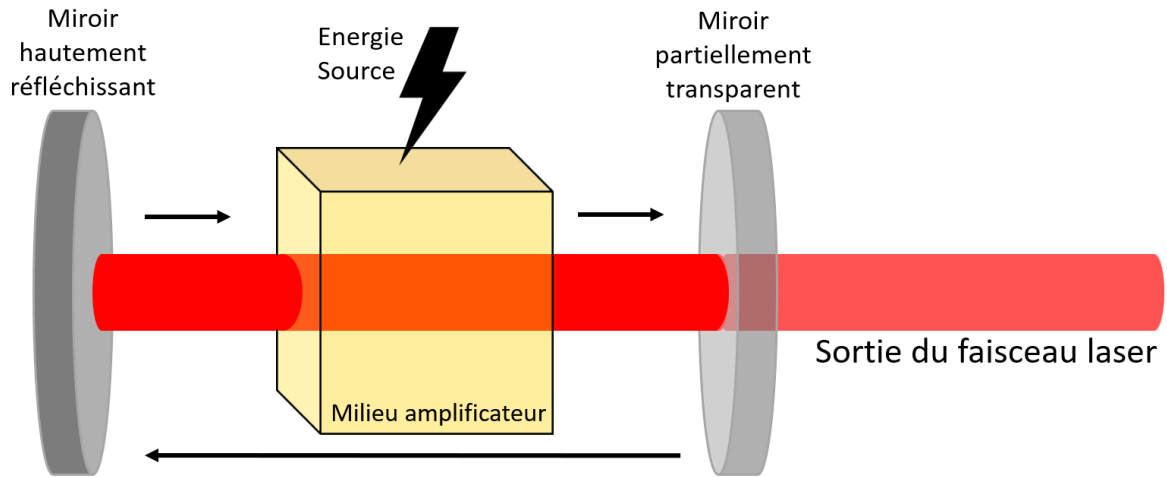


Figure 31: Représentation schématisée d'un système de pompage optique et amplification de lumière par émission stimulée de rayonnement

Le faisceau laser généré possède des propriétés énergétiques intrinsèques dépendantes de la composition du milieu amplificateur, et du système de cavité optique réalisé. Cet ensemble est conventionnellement caractérisé sous l'appellation source laser.

1.4.2 Le LIFT, précurseur de la Bio-impression Assistée par Laser

Bien que les premières utilisations du laser comme outil de transfert de matière sont apparues durant les années 1970 [194], le développement du LIFT « Laser Induced Forward Transfert » (transfert par projection induit par laser), principe fondateur de l'impression assistée par laser telle qu'appliquée par la suite en biologie, fut accordé à Bohandy *et al.* [195] en 1986. Son prototype permettait de déposer du métal sur un support défini (Figure 32). Le système, tel que présenté ci-après, permettait selon ses propres termes « l'écriture directe de métal à partir d'un film de métal déposé sur un support transparent ».

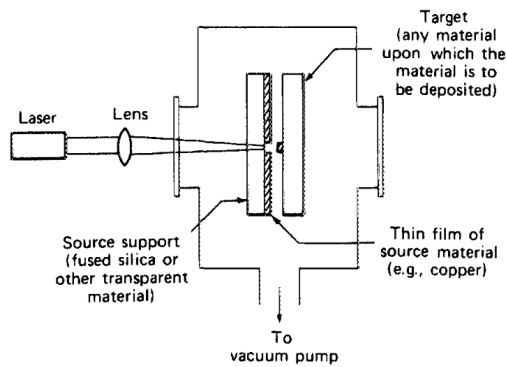


FIG. 1. Schematic description of the apparatus for metal deposition from a solid-phase precursor. The source material and target are in contact during an actual experiment.

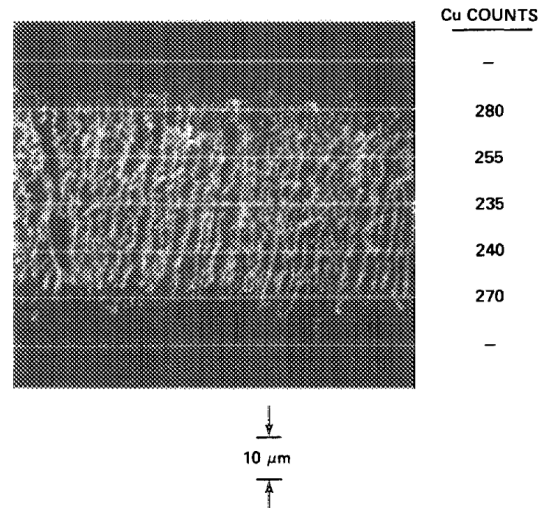


FIG. 3. An x-ray fluorescence profile of the copper deposition obtained with a 110-mJ pulse at 193 nm.

Figure 32: Dispositif de LIFT (gauche) et dépôt de cuivre sur surface receveuse (droite), extrait de Bohandy *et al.*, 1986

Dans cet article, un film de cuivre de $0.41 \mu\text{m}$ d'épaisseur a ainsi été projeté sur un substrat de silicium situé à une distance $<10\mu\text{m}$ du film donneur à l'aide d'un laser à excimère. L'impact du laser sur la couche métallisée a provoqué une élévation massive de température, et la mince couche de cuivre a été localement vaporisée et s'est condensée sur le support receveur. Cette utilisation a créé la possibilité de déposer des éléments selon une résolution spatiale et quantitative sans précédent, associée à une préservation du produit transféré. Dans les années qui ont suivi, l'utilisation de différentes sources laser et différentes stratégies ont abouti à développer diverses méthodes et divers dispositifs d'impression [196].

1.4.3 Adaptations du LIFT vers la biologie

Le LIFT trouva initialement des applications dans l'industrie électronique, notamment pour l'impression de circuits par transfert de métal conducteur avec rapidité et précision [197]. Il faudra attendre les années 2000 pour que le domaine de la Biologie s'empare de cette technologie afin de réaliser le transfert d'éléments biologiques [198], qu'il s'agisse d'hydrogels [199], de cellules [200], ou de matériel plus fin tel que des protéines, des principes actifs ou de l'ADN [201].

Les encres utilisées en LIFT

Dans une revue de littérature consacrée aux utilisations du LIFT en biologie, Antoshin *et al.*[202] mettent en évidence 3 éléments : tout d'abord, dans plus d'un tiers des études (12 sur 33 au total), le milieu de culture des cellules a été utilisé comme seul élément de composition de l'encre en dehors des cellules. Parmi les encres présentées dans cette revue (Figure 33), l'alginate est le composé le plus utilisé (18 études sur 33) pour la formulation d'une bioencre pour une application LIFT, bien que le collagène ait été décrit comme "l'un des meilleurs candidats pour la création de bioencres". Enfin, l'ajout de composants a pour principaux objectifs la modification de la viscosité de l'encre, et prévenir les phénomènes de séchage.

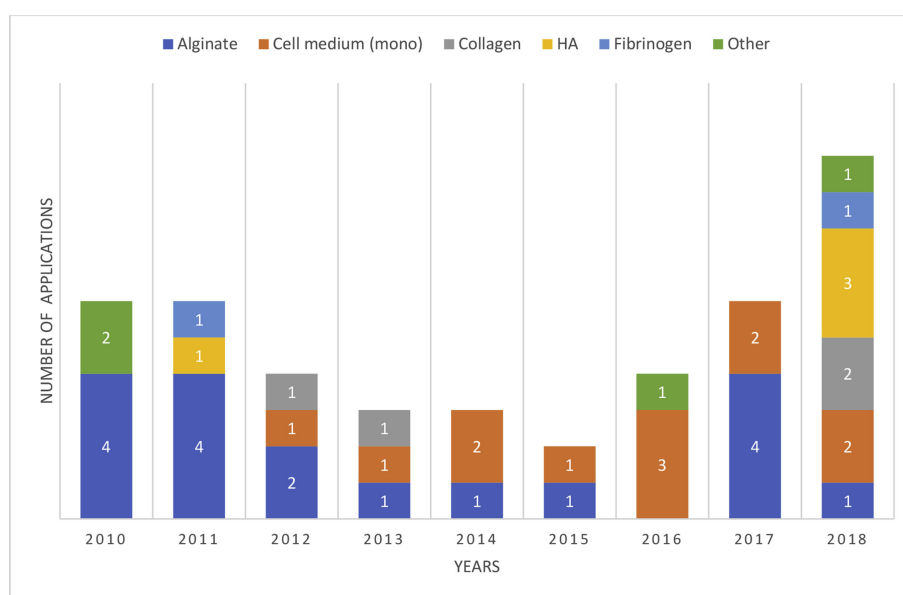


Figure 33: Répartition des types d'encres utilisées en LIFT entre 2010 et 2018 (groupe *other* : thrombine, gélatine, laminine, et Matrigel ; HA: Acide Hyaluronique), Antoshin *et al.*[202]

Dans l'ensemble, les encres formulées pour les applications d'ingénierie tissulaire du LIFT possèdent principalement un rôle de véhicule, de matrice transitoire conçues avant tout pour faciliter le procédé d'impression et le maintien en vie des cellules, avec des propriétés biologiques post-impression intrinsèquement limitées par le transfert de volumes de l'ordre du nanolitre par goutte *in situ*.

Les dispositifs de LIFT

L'ensemble des technologies dérivées du LIFT se résume fondamentalement à 2 éléments: un système d'échange de matière avec une séparation entre le support donneur et le

support receveur, et l'impact d'un faisceau laser qui provoque le transfert de matière par apport d'énergie.

Deux stratégies principales existent. Soit le système prévoit une couche d'absorption d'énergie (EAL/CAE) recouvrant le support donneur, conçue pour protéger le matériau à transférer de l'énergie du faisceau laser. Soit, dans les autres cas, c'est le matériau de transfert qui absorbera directement l'énergie du laser et sera transféré.

Parmi les dispositifs de LIFT adaptés pour des utilisations en Biologie, on retrouve notamment (Figure 34) :

1. Absorbing Film-Assisted LIFT (AFA-LIFT) [203] et Biological Laser Printing (BioLP) [200]: là où le LIFT n'implique que l'application et le transfert d'une EAL de métal, le LIFT assisté par couche d'absorption et l'impression Biologique par Laser reprennent l'idée fondamentale de l'EAL de métal sur laquelle est apposé le matériel à transférer. Les impulsions de laser sont absorbées par l'EAL, à partir de laquelle se crée la bulle de cavitation.
2. Matrix Assisted Pulse Laser Evaporation (MAPLE) [204]: la technique d'évaporation de matrice assistée par impulsion laser ne requiert pas la présence de couche d'absorption de l'énergie (EAL). Le matériau à transférer est conçu pour absorber l'énergie du laser, en fonction de la longueur d'onde de la source. Aussi, la plupart des dispositifs de MAPLE/MAPLE-DW (DW pour Direct Writing) sont associés à des sources plus énergétiques, avec des longueurs d'ondes dans l'ultra-violet. Deux dispositifs existent selon l'orientation et la focalisation du faisceau laser, mais dans tous les cas le matériau va se comporter comme une EAL.
3. Laser Induced Backward Transfer (LIBT) [205]: le rétro-transfert induit par laser est calqué sur le MAPLE-DW, avec pour seule différence l'inversion du montage entre support donneur et receveur. Comme pour le MAPLE-DW, le matériau à transférer est sa propre EAL, mais ce matériau est placé à l'emplacement habituellement attribué au support receveur. L'impact du laser induit la formation d'un jet vertical, mais la goutte de matériel est transférée sur un support placé au dessus. Le faisceau laser traverse donc le support receveur sans interagir avec lui.

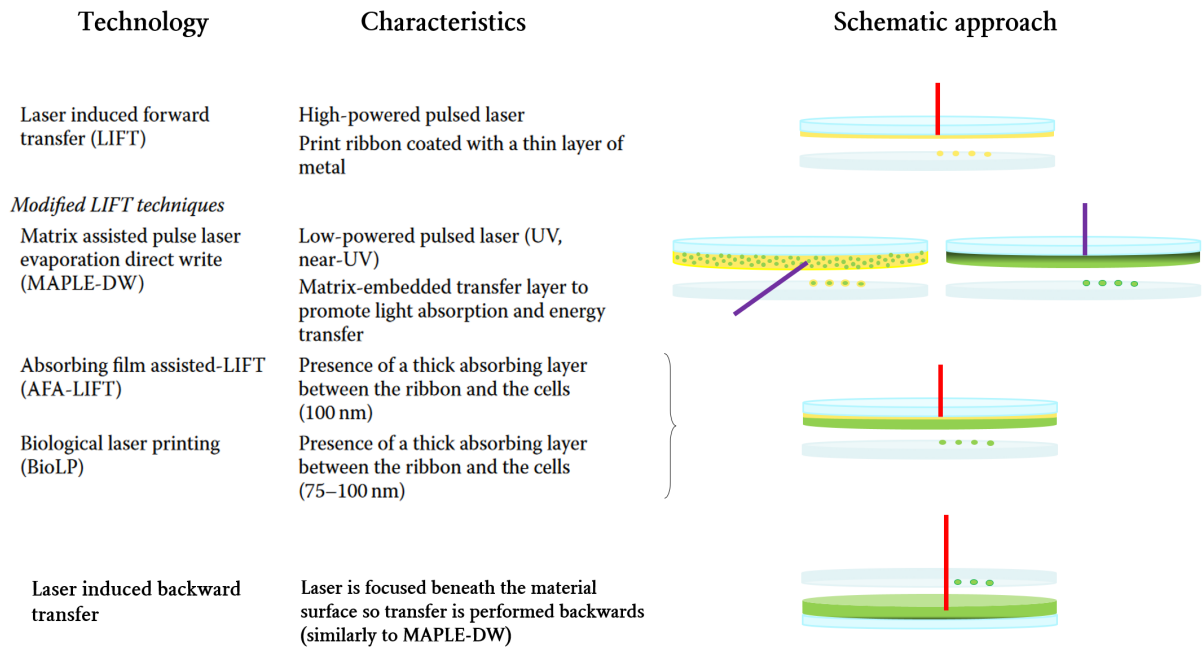


Figure 34: Ensemble des dispositifs de transferts de matières assistés par Laser utilisés en Biologie, repris et modifié de Kerourédan *et al.*, 2018

1.4.4 Mécanismes clés et contraintes relatives à la Bio-impression Assistée par Laser

Bulle de cavitation et formation du jet

Comme évoqué précédemment, l'impact du faisceau laser sur une couche absorbante va provoquer la formation d'un plasma. Ce plasma va entraîner localement une élévation subite de température, de façon radiale, avec pour origine son point de genèse. Cette élévation de température va vaporiser l'encre à l'interface de l'EAL sous la forme d'une bulle dite de cavitation [206]. Cette bulle de vapeur enfle alors, et exerçant une pression sur le liquide qui l'entoure [207]. Dans un liquide infini, la bulle finit par imploser et s'effondre sur elle-même tandis que la température et la pression se dissipent, ce qui renvoie le liquide à son état initial [208]. Cette dynamique de formation et d'effondrement est mathématiquement modélisée par l'équation Rayleigh–Plesset [209, 210].

Dans un modèle tel que ceux correspondants au LIFT et ses dérivés (hors MAPLE), cette dynamique est légèrement différente. En effet, l'EAL constitue une paroi contre laquelle se forme la bulle de cavitation, qui enfle donc comme une demi-sphère (et non une sphère). De plus, le matériel de transfert est une couche liquide mince (de l'ordre de la centaine de micromètres d'épaisseur), qui dispose d'une interface avec l'air [211]. Au moment de l'effondrement de la bulle, le liquide environnant se propage vers l'intérieur de

la bulle en implosion. Dans le dispositif d'impression laser, à l'interface encre/air, l'encre est alors soumise aux forces de déplacement de l'encre liées à l'effondrement de la bulle. Ces forces provoquent la formation d'un jet en direction de l'air, du côté opposé au point initial de formation de la bulle de cavitation.

C'est ce jet, projeté vers le substrat receveur, qui est à l'origine du transfert de matière. Des études ont mis en évidence qu'il existe, dans un dispositif expérimental avec un laser focalisé sur une interface eau/air, deux jets successifs distincts qui se rompent, un premier très fin et court qui suit l'expansion de la bulle de cavitation, suivi d'un second beaucoup plus large et avec une cinétique plus lente qui coïncide avec la fin de l'effondrement de la bulle [212, 213] (Figure 35).

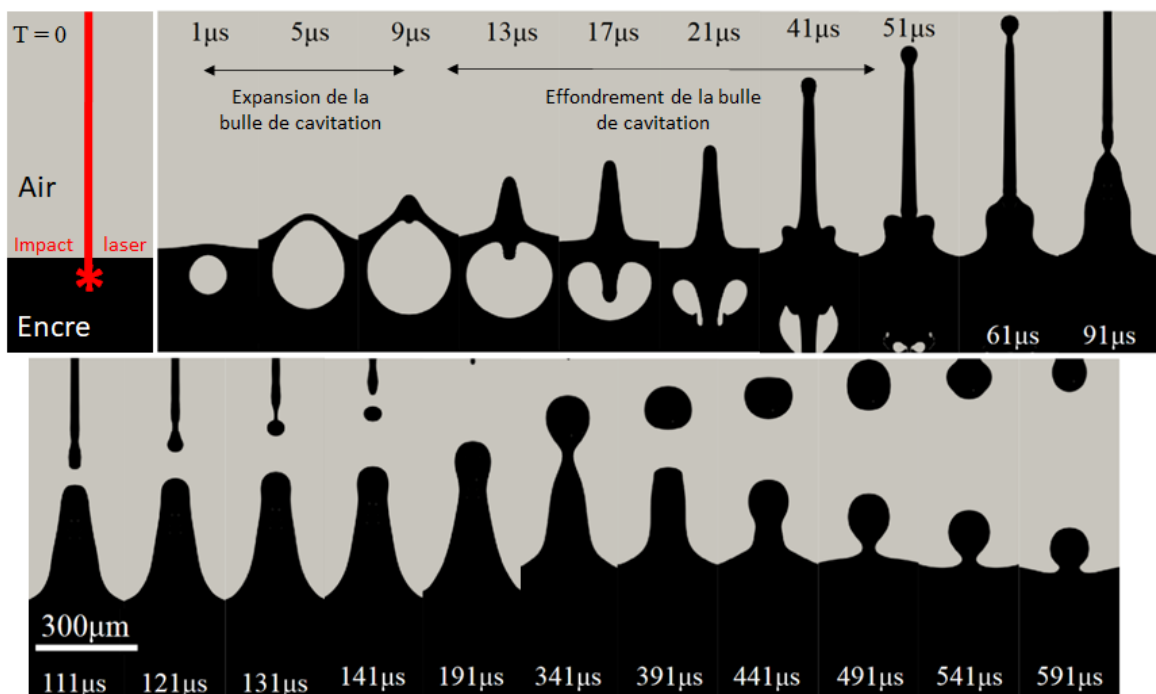


Figure 35: Reproduction *in silico* d'observations par ombroscopie de la formation de jets liés à la dynamique de la bulle de cavitation à une interface eau/air, repris et adapté de Cerbus *et al.*[213]

Tout jet formé va en effet s'étirer jusqu'à se rompre lorsque sa longueur excède sa circonférence, phénomène décrit mathématiquement par Plateau et affiné par Rayleigh sous le terme d'instabilité de Plateau-Rayleigh [214]. Selon la nature du jet rompu et des tensions de surface exercées, une ou plusieurs gouttes vont se former. Si l'énergie cinétique de ces gouttes est suffisante, elles atteignent la surface dite receveuse, achevant le procédé d'impression.

L'impression assistée par laser peut ainsi se résumer à produire une bulle de cavitation pour générer un jet qui va permettre la projection du matériel à transférer. La maîtrise de ce procédé repose sur la capacité à obtenir un jet, de manière répétable et reproductible.

Paramètres influençant la formation du jet

La formation du jet (Figure 36) est influencée par un très grand nombre de paramètres, dont les plus significatifs sont rapportés ici.

1. La formation de la bulle de cavitation [207, 215] : comme décrite précédemment, la formation de la bulle de cavitation est l'étape clé de la formation du jet. La maîtrise de l'hydrodynamique de la bulle de cavitation (taille, pression, position par rapport à la surface du liquide) et des éléments à l'origine de sa formation est donc cruciale. L'un des premiers et plus important paramètre à considérer est l'énergie transférée à la couche d'absorption, qui permet la formation du plasma à l'origine de la bulle de cavitation. Cette énergie est intrinsèque aux caractéristiques de la source et à la cadence de délivrance d'impulsions laser, deux paramètres qui vont déterminer la puissance du dispositif laser. De plus, cette énergie est à rapporter avec la surface du support donneur traversée par le faisceau, pour déterminer la fluence (énergie/surface de focalisation du faisceau) du dispositif d'impression.

En résumé, la maîtrise de la fluence permet la maîtrise de la délivrance de l'énergie apportée à la couche d'absorption pour créer le plasma et la bulle de cavitation. Une énergie délivrée insuffisante se traduira par un plasma trop petit pour former une bulle de cavitation capable d'induire un jet et, à l'inverse, trop d'énergie délivrée sera à l'origine d'une bulle de cavitation disproportionnée compromettant la formation du jet. Le choix de la nature et de l'épaisseur de la couche d'absorption est aussi un élément déterminant.

2. La reproductibilité de la formation du jet et de la relaxation de la bioencre : conséquence directe de l'effondrement de la bulle de cavitation, la formation du jet en elle-même est également soumise à divers facteurs. La formulation de la bioencre [216], par ses propriétés rhéologiques et/ou la présence de particules de tailles diverses pouvant constituer des agrégats, peut affecter les forces de tension de surface qui s'exercent lors de la déformation de l'encre, et peut entraîner une soudaine rupture du jet, puis la création de gouttelettes. L'étalement de la bioencre sur le support donneur, si ce procédé n'est pas effectué de façon répétable et reproductible,

est à l'origine d'une différence d'épaisseur de couche d'encre, qui va influencer la dynamique de la bulle de cavitation et donc la formation du jet. De plus, il y a un risque pour que la quantité de matériau transféré par deux jets soit différente. Enfin, la dynamique spatio-temporelle entre deux impacts laser, c'est à dire les intervalles de durée et de distance entre deux pulses de laser pour créer deux jets différents, peut mener à de grandes disparités de formation de jet. Si deux jets sont formés de façon trop rapprochée dans le temps et dans l'espace, ceux-ci peuvent fusionner et nuire à la qualité finale de l'impression. De même, si une bulle de cavitation est générée tandis qu'un jet est déjà en formation, l'encre n'a pas pu subir de relaxation pour revenir à son état initial, et le second jet, ou les deux, peuvent être affectés par le procédé.

3. L'environnement dans lequel le processus d'impression s'exécute : les paramètres de température, de pression, et de composition du gaz à l'interface des substrats donneur et receveur peut influencer le procédé d'impression et le comportement de l'encre. Conventionnellement, les impressions sont réalisées dans l'atmosphère de la pièce dans laquelle se situe la station de bio-impression. L'hygrométrie est un paramètre essentiel, car les volumes d'encre déposée sur le support donneur sont généralement faibles ($<100\mu\text{l}$), et une atmosphère avec une hygrométrie faible peut considérablement impacter la fenêtre d'imprimabilité du matériau, dont les cinétiques de séchage sur le support donneur seront beaucoup plus rapides. Idéalement, une atmosphère proche de la saturation en humidité relative permettrait de limiter au maximum cet effet négatif.

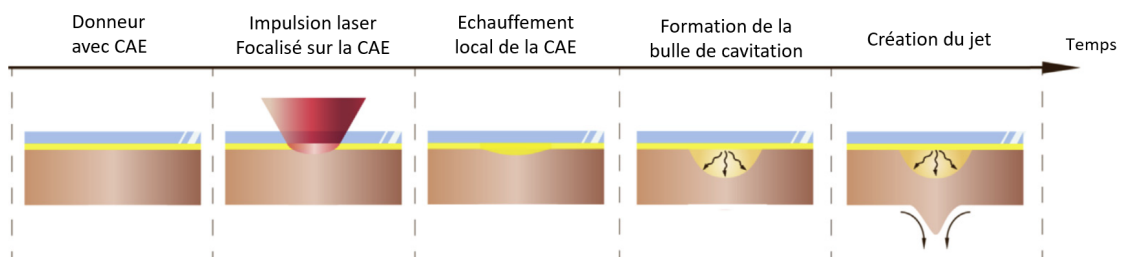


Figure 36: Formation du jet, adapté de Antoshin *et al.*[202]

Les facteurs présentés ici de façon non exhaustive peuvent également être interdépendants : par exemple, une faible hygrométrie va entraîner une évaporation partielle de l'encre, dont la viscosité augmente au cours du temps, modifiant ses propriétés rhéologiques et exigeant une bulle de cavitation de plus grande dimension pour obtenir un jet identique à celui obtenu pour une encre placée dans une atmosphère saturée en humidité.

Scénarios de formation de jet, distincts par leur finalité

Les régimes de jets créés par l'effondrement de la bulle de cavitation sont classés par empirisme selon l'issue du procédé d'impression (Figure 37):

1. Le régime « sous seuil » [217] (*subthreshold regime*), regroupant toutes les conditions aboutissant à une énergie de transfert insuffisante par la couche absorbante pour générer une bulle de cavitation, ou la formation d'un jet qui s'effondre sur lui-même sans éjection d'une goutte vers la surface receveuse ;
2. Le régime « jet » [218] (*jetting regime*), scénario idéal dans lequel une goutte est éjectée de façon reproductible à chaque impact du faisceau laser sur le support donneur selon une orientation spatiale maîtrisée ;
3. Le régime « panache » [219] (*plume regime*), regroupant toutes les conditions pour lesquelles l'énergie transférée par la couche absorbante va engendrer la formation d'un jet non reproductible, résultant en l'éjection d'une ou plusieurs gouttelettes et satellites dans des plans de projections variables.

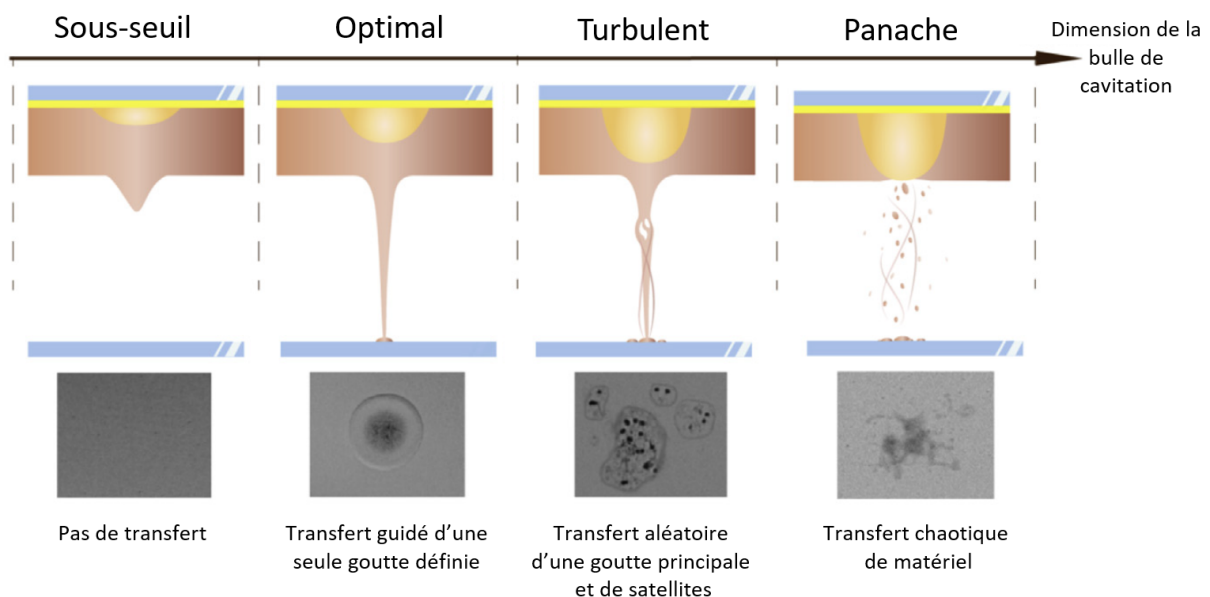


Figure 37: Régimes de jets, adapté de Antoshin *et al.* [202]

Ainsi, bien que les dispositifs, stations d'impression et modèles d'études diffèrent d'un laboratoire à l'autre, la maîtrise de la dynamique de formation d'un jet aboutissant à la projection d'une goutte de bioencre vers un substrat receveur est au cœur du développement des stratégies reposant sur le principe d'impression assistée par laser [220, 221].

1.5 Imprimer *in situ*, *in vivo* : vers un nouveau paradigme de réparation du tissu osseux

La capacité de personnalisation de la programmation et l'automatisation de la bio-impression ouvre des perspectives d'application clinique directe et personnalisée pour les patients [222]. L'enjeu majeur de l'impression *in situ*, *in vivo*, par rapport à la bio-impression indirecte est de pouvoir répondre efficacement (immédiatement, fonctionnellement et de façon personnalisée) au besoin du patient sans devoir passer par un délai imposé de fabrication, stérilisation, bioassemblage et éventuellement, maturation avant implantation [223]. Plusieurs systèmes d'impression directe *in vivo* sont en cours de développement [224] (Figure 38):

Pour le tissu osseux, Li *et al.* [225] ont mis au point en 2021 une station d'impression par extrusion. Leur modèle d'application était un défaut osseux tibial chez le cochon nain. L'impression de leur matériau, de la gélatine methacrylamide (GelMA), avec sodium alginate et polyéthylène glycol diacrylate (PEGDA) a permis d'obtenir des résultats de reminéralisation du site du défaut significativement supérieurs à leurs défauts contrôles laissés vides. Dans cette étude, des plaques de titane ont été utilisées en plus du matériau déposé pour maintenir les capacités de mobilité post-opératoire des cochons nains. Les auteurs décrivent la procédure comme avantageuse car plus rapide (en terme de temps opératoire) en moyenne qu'une intervention chirurgicale conventionnelle.

Di bella *et al.* [226] proposent en 2018 l'utilisation d'un stylo d'extrusion (BioPen) pour combler un défaut cartilagineux chez le condyle fémoral de mouton avec un matériau à base d'acide hyaluronique methacrylé et de GelMA contenant des MSC dérivées du tissu adipeux. L'utilisation de ce scaffold réticulé *in situ* sous l'action de d'un photoinitiateur exposé aux UV, s'est révélée aux temps d'observation précoces comme supérieur à l'utilisation de scaffold imprimé *ex vivo*, de microfracture et de défauts contrôles non traités. Le BioPen est décrit comme ergonomique et utilisable par un chirurgien sans besoin de formation spécifique au préalable.

Pour une application de régénération dermique, Albanna *et al.*[227] utilisent également de l'extrusion, appliquée chez la souris et chez le porc. Les résultats des impressions successives de fibroblastes et kératinocytes associés à une encre de collagène et fibrinogène sur des défauts dermiques ont été comparés à des techniques conventionnelles de dépôt de cellules, et ont mis en évidence une formation plus précoce de derme mature et d'épiderme en utilisant la technique de bio-impression. L'hypothèse avancée par les auteurs pour

expliquer ce résultat réside dans l'organisation spatiale conférée par l'utilisation de la bio-impression. Skardal *et al.* [228] ont développé une station d'impression par jet d'encre, pour une application dans un modèle murin. Des cellules du fluide amniotiques ont été associées à une encre à base d'acide hyaluronique hépariné, réticulée par photopolymérisation aux UV. Cette formulation de bioencre a montré la formation plus rapide d'un tissu cicatriciel, avec une composition plus proche de celle d'une peau native que des contrôles utilisés (acide hyaluronique non hépariné, et sans cellules).

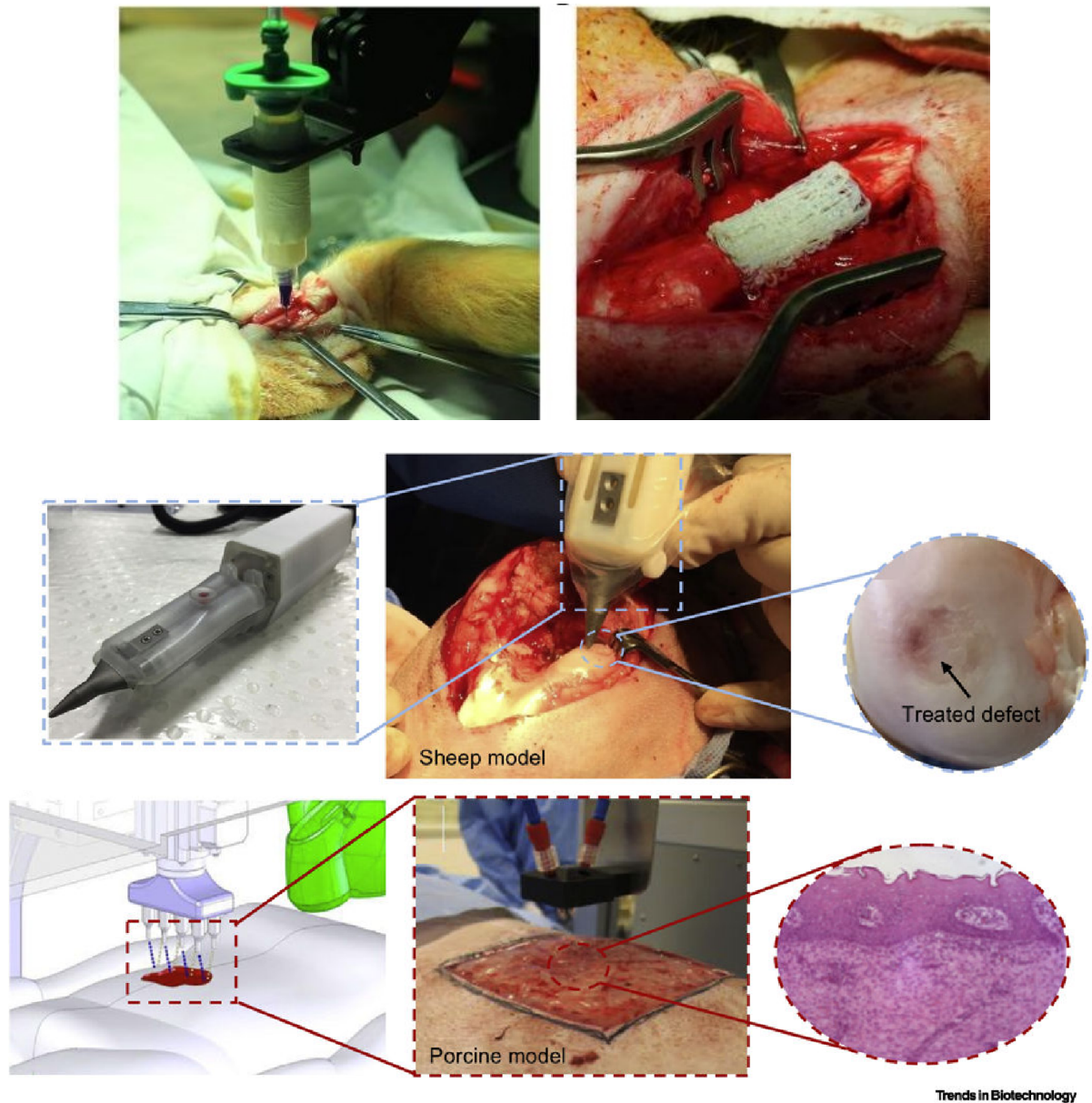


Figure 38: Outils d'impression *in situ* appliqués chez l'animal. Extrusion de matériau chez le cochon nain pour combler un défaut osseux (haut), de Li *et al.* [225]; *BioPen* (milieu), extrusion pour reconstruction cartilagineuse chez le mouton Di Bella *et al.* [226] et droplet (bas) pour la régénération cutanée chez la souris et le porc, Albanna *et al.*[227]

Pouvant si nécessaire être associés à des technologies de scanner [229], ces systèmes permettent l'impression et l'implantation en une seule étape de matériaux directement sur la zone d'intérêt. Actuellement, ces dispositifs demeurent à l'état de prototypes, mais ont pour objectif d'intégrer les salles d'intervention chirurgicale et, à terme, surpasser la performance des outils actuellement utilisés. Sans toutefois remplacer le chirurgien, le développement de ces stratégies d'impression *in situ*, *in vivo* pourrait permettre de soulager une partie de sa charge de travail.

Chapitre 2

Antériorité des travaux & Objectifs

2.1 Antériorité des travaux

2.1.1 La station d'impression NOVALASE

Le laboratoire BIOTIS est équipé depuis 2005 d'un prototype d'impression par LIFT, disposant d'une source laser Nd:YAG de longueur d'onde 1064nm, qui génère des pulses de 30ns à une fréquence ajustable de 1 à 100kHz. La vitesse de déplacement du matériau au moment du transfert a été mesurée aux alentours de 30m/s, pour une distance à parcourir de 1mm entre substrat donneur et receveur. La capacité d'impression de l'appareil est intrinsèque au dispositif de déflexion du faisceau par des miroirs de balayage. Actuellement, l'appareil est capable d'imprimer du matériel sur une surface d'environ 20cm².

Initialement prévue pour de l'investigation *in vitro*, la station Novalase a été modifiée pour permettre la réalisation d'impression *in situ*, *in vivo* grâce à l'ajout, dès 2016, d'un portoir stéréotaxique sur la platine motorisée du support receveur, avec pour modèle de référence un défaut osseux circulaire critique (\varnothing 3.3mm, soit 0.34cm²) de la calvaria chez la souris.

2.1.2 Historique des travaux de bio-impression laser

Ces travaux de thèse font suite à l'ensemble des travaux mené par l'équipe de recherche "Impression Laser" valorisés par plusieurs publications scientifiques internationales:

Année	Avancée	Ref
2010	Première présentation de l'utilisation du LIFT au sein du laboratoire selon différents paramètres et revue de la littérature.	[230]
2010	Démonstration de l'utilisation de la station par impression de motifs composés de deux populations de cellules (Rabbit carcinoma cell line B16 et HUVEC Eahy926), et démonstration de viabilité cellulaire à 24h.	[231]
2011	Impression de nano-hydroxyapatite et de progéniteurs ostéogéniques. Suivi sur 15 jours de la viabilité, de la prolifération et du phénotype	[232]
2014	Description exhaustive du protocole opératoire et impression de cellules multipotentes murines	[233]
2014	Étude de la physique de formation du jet comportant des cellules souches mésenchymateuses murines	[234]
2016	Démonstration que la co-impression de cellules endothéliales et de MSCs permet le maintien spatial des cellules endothéliales (ECs)	[235]
2017	Étude de l'impression de 2 motifs de MSCs avec hydroxyapatite et collagène sur la régénération d'un modèle murin de défaut osseux critique dans la calvaria.	[236]
2019	Démonstration que l'impression de ECs sur une matrice de collagène + MSCs permet le maintien spatial des motifs d'ECs	[237]
2019	Investigation de 3 motifs d'HUVECs imprimés <i>in situ</i> sur une matrice de collagène/MSCs. A quantité équivalente d'HUVECs déposées, la réponse osseuse diffère selon la géométrie employée.	[238]

Table 2.1: Historique des travaux de l'UMR 1026 sur la bio-impression assistée par laser

Les premiers travaux effectués par le laboratoire BIOTIS [230, 231] ont démontré la faisabilité de transfert de cellules par LIFT dans la station d'impression NOVALASE. La bio-impression de cellules a été rendue possible pour des concentrations cellulaires très élevées (entre 50 et 100 millions de cellules par ml). Par la suite, les travaux de l'unité se sont poursuivis par la mise en place d'un suivi plus long et une caractérisation des cellules imprimées sur 15 jours [232, 233], avec des résultats de viabilité cohérents avec la non génotoxicité du procédé d'impression au regard des dommages liés à l'ADN décrits dans la littérature [239–241].

En parallèle, la compréhension de ce procédé s'est renforcée par une étude physique [234] de la dynamique de formation du jet sur la station d'impression. Les travaux dédiés à l'ingénierie tissulaire ont réellement commencé à partir de 2017, avec l'utilisation du modèle de défaut osseux critique chez l'animal [236]. Ce modèle a permis l'évaluation d'une impression directe, *in vivo* et *in situ*, sur la régénération tissulaire. Première du genre, aucune autre station d'impression laser n'a depuis effectué, à notre connaissance, d'impression *in vivo*.

Le travail d'Olivia Kérourédan [237, 238] complète ainsi une continuité de recherche qui gravite autour de deux axes: le contrôle spatial à haute résolution d'éléments biologiques imprimés *via* différents motifs, et l'utilisation d'éléments promouvant la régénération osseuse selon une application directe, *in situ* et *in vivo*.

L'une des conclusions des recherches d'Olivia Kérourédan fut qu'orienter la stratégie de régénération du tissu osseux en favorisant la vascularisation du site du défaut osseux améliorerait significativement le processus de minéralisation du tissu néoformé [237, 238]. Cependant, aucune réparation *ad integrum* n'a pu être observée dans un modèle de défaut critique de calvaria. Malgré la compréhension des mécanismes majeurs influençant la réponse du tissu cible vers une réparation efficace et supra-physiologique du tissu osseux endommagé, l'objectif de régénération totale n'a pas encore été atteint.

L'un des facteurs clés identifiés comme cible potentielle d'investigation était l'absence *in situ* d'un support permettant la colonisation et le soutien, par une rigidité avantageuse, de la différenciation ostéogénique des cellules et progéniteurs mésenchymateux apportés par bio-impression, aussi bien que mobilisés par l'hôte. Ainsi, l'idée d'une approche basée sur l'utilisation d'une encre ayant la propriété d'évoluer d'un état liquide vers un état solide dans un court laps de temps après déposition *in situ* a été retenue pour l'élaboration d'une nouvelle formulation d'encre. Une réflexion autour d'un concept d'encre-ciment biocompatible a émergé.

2.2 Objectifs de la thèse

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans la continuité de l'expertise du laboratoire BIOTIS au regard de la bio-impression assistée par laser, avec la poursuite de 3 axes de recherche: approfondir la compréhension du procédé d'impression assistée par laser, développer de nouvelles encres compatibles avec ce procédé pour des applications d'ingénierie tissulaire, et diversifier le champ d'application de la technologie laser.

Dans ce manuscrit, sont présentées les recherches associées aux deux objectifs suivant:

1. Développer et tester de nouvelles formulations d'encres-matériau pour promouvoir la régénération osseuse *via* l'utilisation de l'impression assistée par laser. Inspiré par les travaux de Doraiswamy *et al.* [242], qui utilisèrent pour la première fois un système de MAPLE-DW en 2007 pour co-imprimer de l'hydroxyapatite, du zircon et des cellules MG63 avec un phénotype ostéoblastique, un travail analogue fut produit au laboratoire en 2011 [232]. L'impression de nanoparticules d'hydroxyapatite (nHA) en forme d'aiguille d'une longueur de 50nm avec un ratio poids/volume de 10% dans l'encre finale fut réalisée *in vitro*. Ces travaux furent poursuivis *in vivo* en 2017 [236], avec l'impression d'une encre avec un ratio poids/volume de 1.2% en nHA. Dans ces travaux de thèse, une autre approche d'encre-matériau est proposée, en développant une formulation à base de silicium tricalcique et testée *in vitro*, et *in vivo* dans un modèle de défaut critique osseux.
2. Développer une plateforme multimodale d'impression combinant différentes technologies, conçue pour être associée à des instruments de chirurgie robotisée au service de la médecine régénérative. Le laser étant au coeur de l'une des technologies de bio-impression développées au laboratoire BIOTIS, l'exploitation de la versatilité de cet outil au-delà d'un contexte de bio-impression a fait l'objet d'une réflexion particulière. Dans ce manuscrit, une nouvelle utilisation du laser comme outil de texturation directe de l'os est initiée.

Chapitre 3

Développement d'une formulation d'encre-matériau à base de silicium tricalcique pour la régénération osseuse

3.1 Les composés à base de Silicium pour la réparation osseuse

3.1.1 Introduction

Identifier la formulation optimale pour surmonter les limites intrinsèques aux biomatériaux synthétiques actuels, tels que des propriétés mécaniques inadéquates, ou une mauvaise reproduction de l'architecture osseuse, demeure un enjeu majeur [243, 244]. Le développement de l'ingénierie tissulaire a conduit à la conception de nouveaux matériaux et de nouvelles stratégies visant à régénérer le tissu osseux plutôt que le remplacer [245]. Au cours des dernières décennies, les matériaux à base de Silicium (Si) ont acquis un potentiel croissant dans l'ingénierie des tissus durs depuis sa première application en 1971 [121, 246] et ont été largement utilisés pour des applications médicales [247].

Facilement disponibles et adaptés à des préparations malléables, les matériaux dérivés du Si ont croisé la route de la fabrication additive [124]. Développée dans la seconde moitié du 20ème siècle [248], l'application de ce domaine à la biologie couvre diverses technologies, utilisées pour fabriquer des objets 3D en éléments minéraux et/ou organiques [141, 249]. Or dans l'ingénierie des tissus osseux, le maintien des fonctions mécaniques requises de l'os est l'un des défis historiques et critiques [250]. À ce titre, la composition des matériaux doit

être compatible avec les stratégies de modélisation de la structure, comme la bio-impression par extrusion, l'approche la plus courante [144]. Dans les applications de régénération et de réparation osseuses, le Si a souvent été utilisé comme substitut ou comme dopant dans les céramiques à base de phosphate de calcium, car il a un impact positif sur les performances des biomatériaux conventionnels, en ce qui concerne la structure chimique de surface, la résistance mécanique, la bioactivité et la biocompatibilité [251]. De plus, la tendance actuelle est de passer des matériaux biocompatibles traditionnels aux matériaux bioactifs, afin de promouvoir une réponse biologique spécifique entre le matériau et le tissu [252].

Parmi les nombreux matériaux et stratégies testés, certaines formulations imprimables contenant du Si ont franchi l'étape de la caractérisation *in vitro*, pour évaluer leur potentiel de réparation osseuse *in vivo*. Ainsi, cette revue systématique propose de faire le point sur la dernière décennie d'applications *in vivo* de matériaux basés sur des stratégies de silicium (bio)imprimé pour l'ingénierie du tissu osseux.

Un criblage algorithmique a permis de dégager 175 articles correspondant à la recherche par combinaison des mots clés et opérateurs logiques suivants :

silic* NOT silicone AND print* AND bone AND 'in vivo'

51 articles ont été retenus de cette pré-sélection, et analysés afin de répondre à la question "quelles formulations d'encres-matériau à base de silicium ont démontré leur efficacité pour la régénération du tissu osseux ?"

Les Méthodes PRISMA, PICO, ARRIVE et Syrcle ont été employées dans la conduite de cette revue systématique de la littérature.

3.1.2 Original review: *In vivo* application of silica-derived inks for bone tissue engineering: a 10-years systematic review

Systematic Review

In Vivo Application of Silica-Derived Inks for Bone Tissue Engineering: A 10-Year Systematic Review

Nicolas Touya ¹, Ayako Washio ², Chiaki Kitamura ², Adrien Naveau ^{1,3,4}, Yasuhiko Tabata ⁵, Raphaël Devillard ^{1,3,4} and Olivia Kérourédan ^{1,3,4,5,*}

¹ Univ. Bordeaux, INSERM, BIOTIS, U1026, F-33000 Bordeaux, France

² Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Oral Function, Kyushu Dental University, 2-6-1 Manazuru, Kokurakita-ku, Kitakyushu 803-8580, Japan

³ Faculty of Dentistry, University of Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux, France

⁴ CHU de Bordeaux, Pôle de Médecine et Chirurgie bucco-dentaire, Place Amélie Raba Léon, F-33076 Bordeaux, France

⁵ Laboratory of Biomaterials, Department of Regeneration Science and Engineering, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8397, Japan

* Correspondence: olivia.kerouredan@u-bordeaux.fr

Abstract: As the need for efficient, sustainable, customizable, handy and affordable substitute materials for bone repair is critical, this systematic review aimed to assess the use and outcomes of silica-derived inks to promote in vivo bone regeneration. An algorithmic selection of articles was performed following the PRISMA guidelines and PICO method. After the initial selection, 51 articles were included. Silicon in ink formulations was mostly found to be in either the native material, but associated with a secondary role, or to be a crucial additive element used to dope an existing material. The inks and materials presented here were essentially extrusion-based 3D-printed (80%), and, overall, the most investigated animal model was the rabbit (65%) with a femoral defect (51%). Quality (ARRIVE 2.0) and risk of bias (SYRCL) assessments outlined that although a large majority of ARRIVE items were “reported”, most risks of bias were left “unclear” due to a lack of precise information. Almost all studies, despite a broad range of strategies and formulations, reported their silica-derived material to improve bone regeneration. The rising number of publications over the past few years highlights Si as a leverage element for bone tissue engineering to closely consider in the future.

Keywords: biofabrication; bioprinting; ink; tissue engineering; bone regeneration; 3D printing; silicon; silica; silicium; in vivo



Citation: Touya, N.; Washio, A.; Kitamura, C.; Naveau, A.; Tabata, Y.; Devillard, R.; Kérourédan, O. In Vivo Application of Silica-Derived Inks for Bone Tissue Engineering: A 10-Year Systematic Review. *Bioengineering* **2022**, *9*, 388. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080388>

Academic Editor: Kaili Lin

Received: 22 July 2022

Accepted: 12 August 2022

Published: 15 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bone defects, whether due to infection, tumor, trauma, surgery, aging or genetic disorders, are a major health issue, affecting hundreds of millions of people every year [1]. Although a human bone graft remains the gold standard therapy, the demand outmatches the supply. A wide range of synthetic biomaterials has been developed to overcome limitations associated with the use of autografts and allografts such as morbidity on the donor site for autografts, and the lack of availability and risks of disease transmission, infection and immunogenicity for allografts [2]. Xenografts and xenogenic products are an uprising therapeutic field but also tend to suffer from graft drawbacks. Synthetic materials offer a more affordable alternative; however, they can be criticized because of their limited osteoconductivity, inadequate mechanical properties, unpredictable dissolution kinetics and poor reproduction of bone architecture [3]. Hence, the optimum formulation to overcome these hurdles is still to be found. Moreover, the development of tissue engineering has led to the design of new materials and strategies aiming at bone tissue regeneration instead of bone tissue replacement [4].

During the last decades, silica-based materials have gained a rising potential in hard tissue engineering since their first application in 1971 [5,6] and have been widely used for medical applications [7].

Silicon (Si) is the eighth-most common element in the universe by mass. More than 90% of the Earth's crust is composed of silicate minerals, making silicon the second most abundant element in the crust (about 28%) after oxygen [8]. Many studies have shown the important biological role of Si in humans [9] and revealed its presence at various rates in many tissues within the body, such as the liver, kidney, lungs, muscle, bone, cartilage and other connective tissues [10].

At the bone level, silicon is an essential nutrient for tissue formation. In the early 1970s, a deficiency of Si was demonstrated to be involved in bone formation disorders [11,12]. Many authors reported enhanced bioactivity of biomaterials due to the presence of Si, which promotes collagen type I synthesis, osteoblastic differentiation and bone repair [13]. Indeed, Si plays a key role in connective tissue metabolism, particularly in bone and cartilage [14]. In osteoporosis and osteopenia, the reduced proliferation and activity of osteoblasts were found to be correlated to the loss of the biological availability of Si [15]. Other experimental studies have shown the role of Si in the remodeling process of bone and suggested its effect on the inhibition of the physiological resorption mechanisms [16,17].

These findings highlight the obvious interest and high potential of silicon inclusion in biomaterials used for bone regeneration.

Easily available, and suitable for malleable preparations, silicon-derived materials crossed the path of additive manufacturing [18]. Developed in the second part of the 20th century [19], the application of this field to biology covers various technologies, used for fabricating 3D objects in mineral and/or organic elements [20,21]. In bone tissue engineering, sustaining the required mechanical functions of bone is one of the historical and critical challenges [22]. As such, material composition must be compatible with strategies of construct modeling, such as extrusion-based bioprinting, the most common approach [23]. Another crucial point is to induce a favorable biological response to restore or supply the lost bone function. Often, the desired outcome is to locally obtain the mineralization of the tissue replacing the bone defect, which will eventually be remodeled as a bone tissue as mature and physiologically competent as native bone. Therefore, research is heavily focused on developing suitable materials that bring a satisfying answer on these two levels, exhibiting robust mechanical properties with a high biocompatibility and strong regenerative potential. Thus, in the scope of identifying the most efficient materials for bone tissue engineering, investigations of silicon-derived materials were extensively conducted, as it has been widely demonstrated to be an essential component of different types of biomaterials such as bioactive ceramics in bone repair/regeneration [24].

In bone regeneration and repair applications, silicon has often been used as a substitute or a dopant in calcium phosphate-based ceramics since it has a positive impact on the performance of conventional biomaterials, related to the surface chemical structure, mechanical strength, bioactivity and biocompatibility [25]. Moreover, the current trend has shifted from traditional biocompatible materials to bioactive materials, to promote a specific biological response between the material and the tissue, leading to the development of a bond between them [26].

Indeed, several research studies have been conducted in the past [27,28], notably, regarding physiologically relevant compounds such as hydroxyapatite [29] or collagen [30], but none specifically concerned with the use of silicon.

Of the numerous materials and strategies assayed, some printable silicon-containing formulations went through the *in vitro* characterization to evaluate their *in vivo* bone repair potential. Thus, this systematic review proposes to report on the last decade of *in vivo* applications based on (bio)printed silicon strategies for bone tissue engineering.

2. Materials and Methods

2.1. Protocol

The systematic review was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) guidelines [31], using the Population, Intervention, Comparison and Outcome (PICO) methods [32] to define the search strategy. The protocol was registered in PROSPERO database (CRD42022311293).

2.2. Focused Question

The following focused question was defined: “Which silica-based ink formulations have been shown effective for bone tissue regeneration?”

2.3. Selection Criteria

In vivo preclinical studies involving the use of silica-based ink for bone regeneration were included. Only studies published in English with their abstracts available on the database were considered. In vitro and ex vivo studies, case reports and reviews were excluded.

2.4. Search Strategy

The search strategy was developed based on the PICO reporting system (Table 1). A structured electronic search for articles published in English was conducted up to and including 10 April 2022 using the electronic databases MEDLINE (PubMed), Scopus and Web of Science.

Table 1. Systematic search strategy (PICO model).

Category	
Population	Animals with created bone defect
Intervention	Printed silica-based ink
Comparison	Untreated or controls
Outcome	Results of bone regeneration
Search combination	PubMed: ((silic*[Title/Abstract]) AND (print*[Title/Abstract]) AND (bone[Title/Abstract])) NOT (silicone[Title/Abstract]) AND ((in vivo[Title/Abstract]) Scopus: (TITLE-ABS-KEY (silic* AND print* AND bone AND NOT silicone) AND TITLE-ABS-KEY (in AND vivo)) Web of Science: silic* (Topic) AND print* (Topic) AND bone (Topic) NOT silicone (Topic) AND in vivo (Topic)
Language	English
Electronic databases	MEDLINE/PubMed, Scopus, Web Of Science

The following search combination was used:

PubMed: ((silic*[Title/Abstract]) AND (print*[Title/Abstract]) AND (bone[Title/Abstract])) NOT (silicone[Title/Abstract]) AND ((in vivo[Title/Abstract])

Scopus: (TITLE-ABS-KEY (silic* AND print* AND bone AND NOT silicone) AND TITLE-ABS-KEY (in AND vivo))

Web of Science: **silic*** (Topic) AND **print*** (Topic) AND **bone** (Topic) NOT **silicone** (Topic) AND **in vivo** (Topic)

The keyword “silicone” was intentionally removed from the research outcome, being already described as a poor, detrimental material for bone repair [33]. Thus, all silicone-based approaches were excluded from the research scope.

Additional articles complemented the electronic search after manually screening the list of references of all publications selected. The searches were re-run just before the final analyses to retrieve the most recent studies eligible for inclusion.

2.5. Screening Methods and Data Extraction

All references were imported into a Zotero database. After eliminating the duplicated ones, references were exported to an Excel sheet to perform the screening phases. The articles were selected by two reviewers (NT and OK) working independently. The selection was performed in two phases, based on inclusion and exclusion criteria: (1) title/abstract screening, (2) full-text screening. The two lists of selected references were then compared and all disagreements were resolved by discussion, or, if persistent, by a third reviewer (RD).

Prioritized exclusion criteria were as follows: (1) during title/abstract screening, no application in bone regeneration, reviews, in vitro or ex vivo studies, clinical trials, cases reports, no silica-based material ink, (2) during full-text screening, no relevant outcome measure reported, no control group.

For eligible studies that matched with inclusion criteria, full text was screened to extract data by two reviewers using the data extraction form and was summarized in the form of Excel-based extraction tables. Data were extracted from text, tables and graphs. Extraction information included but was not limited to: data for evidence synthesis (study design, animal model, intervention of interest, primary and secondary outcomes), as well as information required for assessment of study quality and assessment of risk of bias. In case of missing data, the corresponding authors were contacted via email. Any disagreement between reviewers was resolved by discussion with the third reviewer (RD).

2.6. Science Mapping Analysis

Science mapping analysis of scientific domains was performed from the list of included articles by using keyword co-occurrence networking on VOSviewer (free software, version 1.6.18, Centre for Science and Technology Studies, Leiden University, Leiden, The Netherlands, 2022). Network analysis of the keywords was generated from the matrix of retrieved papers [34] (threshold value at 4). The terms–document matrix allowed to measure document similarities between clusters of topics.

2.7. Quality Assessment and Risk of Bias

The methodological quality and risk of bias of the studies included were assessed by two independent reviewers.

The ARRIVE 2.0 guidelines for reporting animal research were used to evaluate the quality of the studies. The items evaluated according to ARRIVE 2.0 [35] (“reported”, “not reported”, “unclear”) were: (1) study design, (2) sample size, (3) inclusion and exclusion criteria, (4) randomization, (5) blinding, (6) outcome measures, (7) statistical methods, (8) experimental animal, (9) experimental procedures, (10) results, (11) abstract, (12) background, (13) objectives, (14) ethical statement, (15) housing and husbandry, (16) animal care and monitoring, (17) interpretation/scientific implications, (18) generalizability/translation, (19) protocol registration, (20) data access, (21) declaration of interests.

The risk of bias was evaluated using the SYRACLE (Systematic review Center for Laboratory Animal Experimentation) tool for animal studies [36], using the following criteria: (1) random sequence generation, (2) baseline characteristics, (3) allocation concealment, (4) random housing, (5) blinding of participants and personnel, (6) random outcome assessment, (7) blinding of outcome assessment, (8) incomplete outcome data, (9) selective outcome reporting, (10) other risk of bias. Three categories of potential bias judgments were used: “low risk of bias”, “high risk of bias”, “unclear risk of bias”.

Two reviewers (NT and OK) were involved in assessment of risk of bias and study quality. When no consensus was reached, discrepancies were resolved by a third reviewer (RD).

2.8. Data Analysis

Data analysis was performed in a descriptive way due to heterogeneity of the included studies in terms of animal model, bone defect model, interventions and outcomes. No meta-analysis was considered for this systematic review. Summary tables were intended to provide the most relevant information on study characteristics and findings. In particular, the descriptive analysis explored the relationships between studies and described the impact of various silica-based ink formulations on bone regeneration process.

3. Results

3.1. Systematic Review following PRISMA Guidelines

After application of the inclusion and exclusion criteria, 175 articles were selected initially.

The search using the PICO model, yielded 43 articles from MEDLINE/PubMed, 62 articles from Scopus and 70 articles from Web Of Science within the past 10 years. After the removal of duplicates/triplicates and preliminary analysis of the abstracts, 95 articles were selected for full-text analysis and evaluation, after which 44 articles were excluded and 51 articles were included in the review (Figure 1).

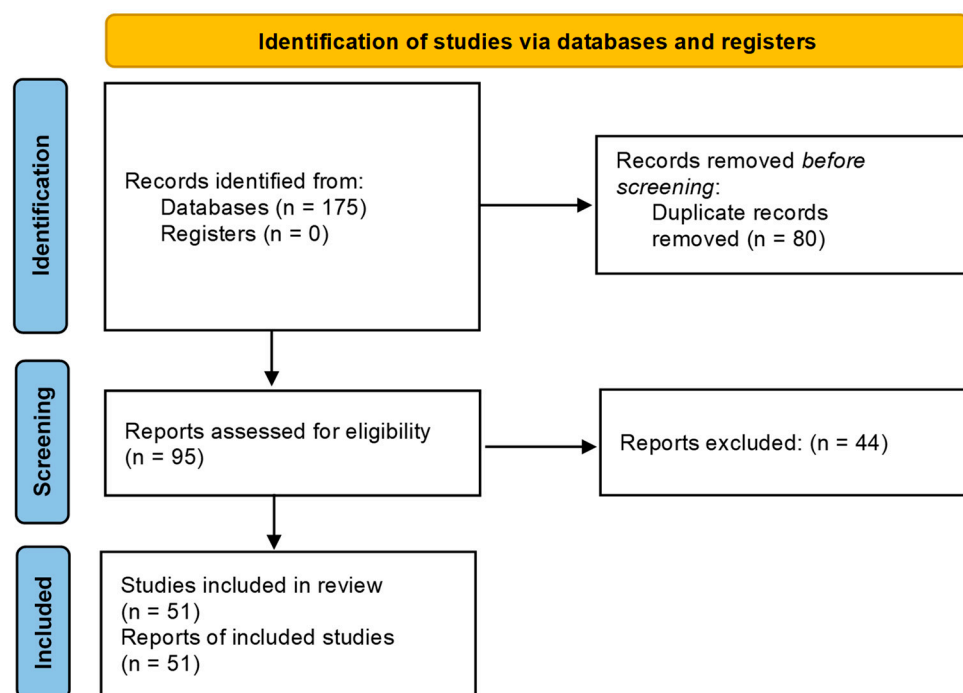


Figure 1. Flow diagram of study identification following PRISMA guidelines.

The spatial representation of the relationships between the keywords was displayed through a science map (Figure 2). The core, most recurrent keywords were (by decreasing rank): “tissue scaffold”, “animals”, “osteogenesis”, “printing, three-dimensional” and “bone regeneration”.

This occurrence representation map highlighted three silicon forms used within the scoped articles: silicon, silicon dioxide and silicates. With one form excluding the others, those keywords had no link strength between each other, and were located in opposite areas. Of the material formulation-related keywords drawn by the occurrence map, silicon was observed to be closest to ceramics, while silicon dioxide was associated to calcium phosphate and silicates was near polyesters and calcium compounds.

The most occurring physical characteristics were porosity, compressive strength and X-ray diffraction. “Mesenchymal stem cells” was among the top 30 most recurring words/phrases and the only cellular population mentioned, and the most represented biological analyses were neovascularization, cell proliferation and differentiation.

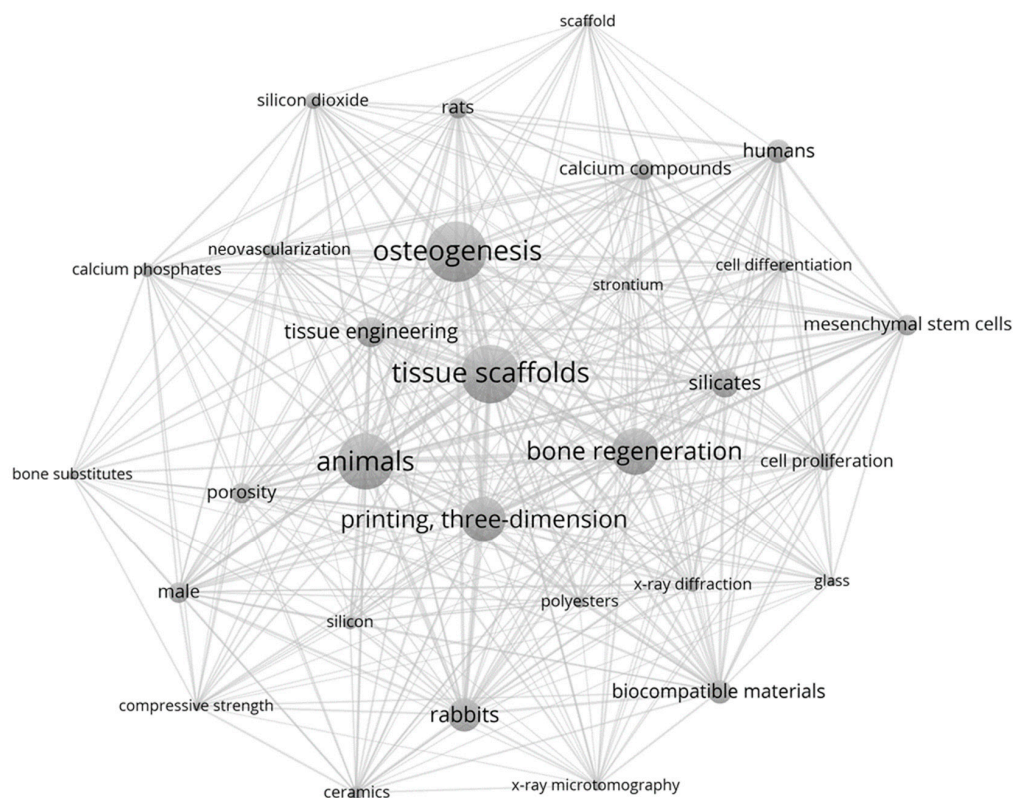


Figure 2. Science mapping analysis of scientific domains: keyword co-occurrence networks among the included articles. Each node size is proportionate to its degree and link’s thickness represents the tie strength.

3.2. Study Characteristics

In the scoped articles, three animal models were assessed (Figure 3): rabbit (65%), rat (29%) and mouse (6%). Interestingly, no large animals (sheep, goat) were involved. It is worthy to note that the number of articles was here correlated to the size of the model. Two preferential bone models were used: femur (51%) and calvaria (25%). In this review, only bone regeneration was considered as a crucial criterion, and no specific consideration was given to mechanical assessment. However, except calvaria and maxillary, all bone models in this review are associated with motion and superior load-bearing capacity.

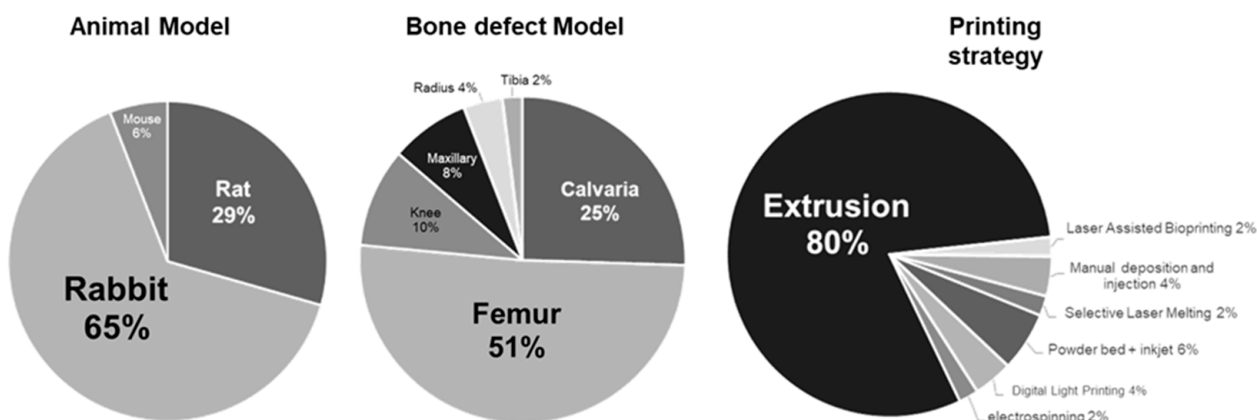


Figure 3. Overall animal/bone defect models and printing strategies repartition among the reviewed articles. Rabbit, femur and extrusion constituted the majority of the articles’ focuses.

Seven assembling strategies were performed in the articles gathered for this review. An overwhelming number of studies employed extrusion-related techniques (80%), and the

six other strategies shared the other 20%. Within this minority, inkjet-associated strategies were the most representative [37–39] (6% of total), while digital light processing [40,41] and manual deposit or injection [42,43] were both 4%. Electrospinning [44], laser-assisted bioprinting [45] and selective laser melting [46] shared equally the 6% remaining (2% each). The trend of the studies assessing silicon-based inks was here to obtain an extrudable paste, mostly mixed with polyvinyl alcohol (PVA), that went through a sintering process after the printing step.

To summarize, the most recurrent combination of models and approaches assessed in the present review were: rabbit–femur–extrusion. The probability of retrieving a study (among the scoped articles) investigating the extrusion of a scaffold implanted in a femoral defect of rabbit was calculated and found to be $P_{(e \times f \times r)} = ((0.8 \times 0.51 \times 0.65) = 0.2652$ (26.25%). In this study, $P_{(e \times f \times r)} \times N_{(articles)} = 13.52$ articles should therefore theoretically associate those three designs. Seventeen articles (33.3% of total) were actually found to present those characteristics, giving a 6.8% difference between the predicted value and the actual number of articles assessed.

The main data from the articles selected are shown in Table 2 and Figure 4, and additive information may be found in the Supplementary Data Table.



Figure 4. Overall silicon form and role repartition among the scoped articles.

Table 2. Bone repair outcomes of the scoped articles sorted by silicon form, role and investigated formulation.

Si Form	Si Role	% of Articles	Main Focus	Number of Articles	Outcome	Publications
Si is in native material	with a primary role	21.6%	CaSiO ₃ scaffolds	2	<ul style="list-style-type: none"> - improved bone regeneration (vs. CaSiO₃/Fe composite or pure Fe scaffold) - improved bone regeneration (vs. B-TCP) 	Ma 2018 [47] Wu 2012 [48]
			MgCaSi compounds	3	<ul style="list-style-type: none"> - MCS/GA/PCL: 30% MCS formulation improved bone regeneration (vs. 0 and 15%) - CaSi-Mg6/PVA: Double layer CSi/PVA improved bone regeneration at 12 weeks (vs earlier times and vs. CaSi-Mg6/PVA single composites) - Mg2% CaSi/PVA6%: improved bone regeneration (vs. Ti scaffold) 	Zhang 2018 [49] Shao 2017 [50] Wang 2021 [51]
			Sr ₅ (PO ₄) ₂ SiO ₄ (SPS) bio-ceramics	1	improved ICRS score (vs. CTR and TCP). Improved neobone structural organization	Deng 2018 [52]
			borosilicate glass (BG) with MBG	1	improved bone regeneration (vs. BG alone)	Qi 2018 [53]
			MBG/CSH/PCL	1	60% MBG: improved bone regeneration (vs. lower % BG or CSH/PCL alone)	Qi 2017 [54]
			C ₃ S materials	2	<ul style="list-style-type: none"> - C₃S/MBG: improved bone regeneration (vs. C₃S alone and vs. ctrl) - C₃S/CoII: no significant bone regeneration (vs. ctrl), or by adding cells (SCAPs) 	Pei 2016 [55] Touya 2022 [45]
			LiCaSi	1	L ₂ C ₄ S: improved bone regeneration (vs. β-TCP)	Chen 2019 [56]

Table 2. Cont.

Si Form	Si Role	% of Articles	Main Focus	Number of Articles	Outcome	Publications
Si is in native material	with a secondary role (1/2)	56.8%	Organic doping	9	<ul style="list-style-type: none"> - dECM coating CS/PCL scaffold: improved bone regeneration (vs. CS/PCL alone) - Ginsenoside Rb1-loaded CS scaffold: improved bone regeneration (vs. CS alone) - Caffeic acid coated MTA/PCL: improved bone regeneration (vs. no coating) - FGF-loaded CS/PCL scaffold: improved bone regeneration (vs. CS/PCL alone) - SVVYGLR grafted on CS scaffold: improved bone regeneration (vs. CS alone) - BMSCs-loaded Mg8-CS scaffold: no significant difference in bone formation (vs. no BMSCs loading) - rhBMP-2-loaded MS/CPC scaffold: improved bone regeneration (vs. CS alone) - FGF-2-loaded gelatin/MgCS/PCL: improved bone regeneration (vs. gelatin/MgCS/PCL vs. MgCS/PCL) - Zein/n-MS/PCL: improved bone regeneration (20%ZN/30%n-MS/50%PCL vs. 10%ZN/30%n-MS/60%PCL vs. 0%ZN/30%n-MS/70%PCL) 	<p>Wu 2019 [57] Chen 2021 [58] Tien 2021 [59] Kao 2020 [60] Zhu 2020 [61] Shen 2018 [62] Li 2017 [63] Lai 2021 [64] Ru 2018 [65]</p>
Si is in native material	with a secondary role (2/2)		Non-organic doping	8	<ul style="list-style-type: none"> - Cu-loaded silica nanoparticles in PLGA: improved bone regeneration (vs. SN alone or PLGA alone) - SrCS/PCL scaffold: improved bone regeneration (vs. CS/PCL alone) - Mg/Sr-doped CS: improved bone regeneration (vs. MgCS or SrCS) - Graphene/CS scaffold: improved bone regeneration (vs. 0 graphene) - Csi-Mg10/PVA6%/alginate/chitosan: improved bone regeneration (vs. Csi alone) - Csi-Mg14/PVA 6%: improved bone regeneration (vs. every inferior Csi-Mg compound) - CsiMg4@CsiMg10-p/PVA 6%: improved bone regeneration (vs. CsiMg4@CsiMg10 vs. CsiMg10@CsiMg4 vs. CsiMg10@CsiMg4-p) - (10%Mg90%Ca)Si: 8 weeks lower but 16 weeks improved bone regeneration (vs. bredigite and vs. pure CaSi) 	<p>Lian 2020 [44] Chiu 2019 [66] Lin 2022 [67] Lin 2019 [68] Ke 2020 [69] Sun 2016 [70] Chen 2021 [71] Shao 2018 [72]</p>

Table 2. Cont.

Si Form	Si Role	% of Articles	Main Focus	Number of Articles	Outcome	Publications
Si is in native material	with a secondary role (2/2)		Multiple doping	2	<ul style="list-style-type: none"> - BMP2-loaded MBG-coated 1393BG: improved bone regeneration (vs. 1393 alone) (BMP2-loaded > MBG + 1393) - hGF and Sr-loaded CS: improved bone regeneration (vs. Sr loading alone and vs. CS alone) 	Wang 2020 [73] Wang 2021 [74]
			New scaffold as whole	7	<ul style="list-style-type: none"> - LCS (Li₂Ca₂Si₂O₇): improved bone regeneration and ICRS (vs. ctrl and β-TCP) - B-BG and 30 wt% sodium alginate: improved bone regeneration (vs. HA and ctrl) - Al-β-Ca₂SiO₄: improved bone regeneration (15%Al vs. C2S alone) - Si-HA/DMB/PCL: qualitatively appreciated bone colonization - MPC3-BG: improved bone regeneration (vs. MPC alone and ctrl) - AW/PLA: improved bone regeneration (vs. AW alone or PLA alone) - akermanite (Ca(2)MgSi(2)O(7))/PVA: improved bone regeneration (vs. β-TCP) 	Deng 2018 [75] Zhang 2020 [76] Yu 2020 [77] Meseguer 2013 [78] Li 2020 [43] Teacencu 2018 [79] Liu 2016 [80]
			porosity	2	<ul style="list-style-type: none"> - 600 μm pores: most bone ingrowth, good mechanical strength and excellent Mg²⁺ ion release potential (vs. 480 and 720 μm pores) - 200–320 μm pores: slower degradability but improved bone regeneration (at 16 weeks vs. 450–600 μm pores) 	Qin 2022 [41] Wu 2021 [40]
			surface treatment	1	C ₃ S with nanoneedle surface structure: improved bone regeneration (vs. no treatment)	Yang 2017 [81]

Table 2. Cont.

Si Form	Si Role	% of Articles	Main Focus	Number of Articles	Outcome	Publications
Si is an additive material	with a primary role	19.6%	Doping	9	<ul style="list-style-type: none"> - SiO₂ and ZnO in β-TCP scaffolds: improved bone regeneration (vs. no doping) - Si-BG-loaded PLA scaffolds: equal integration and bone regeneration (vs. Ti6Al4V and vs. empty defects) - SiO₂ and MgO (0.5%) in β-TCP scaffolds: improved bone regeneration (vs. no doping) - MgO, ZnO, SrO and/or SiO₂ in TCP: Mg/Si-doped scaffold improved bone regeneration (vs. all others and pure TCP) - Si + 4 and Fe + 3 doping in TCP: enhanced blood vessels and osteoid tissue formation (vs. TCP alone) - 100 nm Si particles in PCL: enhanced bone regeneration (vs. 500 and 800 nm particles) - SiP nanosheets in GelMA-PEGDA: enhanced angiogenic activity and osteogenic induction for bone regeneration (vs. BP/GelMA-PEGDA and GelMA-PEGDA alone) - SiO₂ (0.5%) and ZnO (0.25%) in β-TCP scaffolds: improved bone regeneration (vs. no doping) - 10% Zn-Silicate/HA/Col: improved bone regeneration (vs. 10% Zn-Silicate/HA/Col + P38 inhibitor and 10% Zn-Silicate/HA ... + Col ERK1/2 inhibitor) 	<p>Nandi 2018 [39] Plyusnin 2020 [82] Bose 2017 [37] Ke 2019 [83] Bose 2018 [38] Yang 2021 [42] Xu 2021 [84] Fielding 2013 [85] Song 2020 [86]</p>
			Coating	1	<ul style="list-style-type: none"> - MBG-BG-coated Ti-6Al-4V: improved bone regeneration (vs. no coating) 	<p>Zhang 2021 [46]</p>
	with a secondary role	2%	Chitosan + BGn70 + Tri	1	<p>Chit@BGn70 + Tri (tri-molecule dexamethasone-FGF2-phenamil-loaded chitosan/bioglass-coated PCL scaffold): improved bone regeneration (vs Chit@BGn70 vs. ctrl)</p>	<p>Kim 2021 [87]</p>

The list of articles was divided into two main categories, for silicon was either part of the native material (1), or was added as an external component of the initial material assessed (2). In each category, two additional subcategories were created to sort the studies depending on the fact that the silicon has either a primary role (a), or a secondary role (b) over the bone regeneration assessed (Table 3).

Table 3. Decision table of articles sorting.

Category	Si Is in the Native Material	Si Is Primary in the Study
1a	Yes	Yes
1b	Yes	No
1c	No	Yes
1d	No	No

By creating these four categories, all the articles retrieved via the algorithm employed were able to be sorted without the possibility of an article belonging to more than one category. Closest articles were then gathered by focus of interest, creating final subcategories with the largest size possible.

Three main sources of Si were identified: tetraethyl orthosilicate (TEOS) (37%), pure SiO_2 (29%) and wollastonite (CaSiO_3) (20%). The remaining 14% of sources were shared by Ca_2Si , Ca_3Si , Na_2SiO_3 and $\text{RSiO}_{3/2}$, or were of undefined origin. According to the sorted articles, TEOS and CaSiO_3 were principally involved as scaffold basal constituents, while SiO_2 free forms were mostly presented as doping agents.

3.3. Outcomes

3.3.1. Articles' Sorting and Main Outcomes

- Category 1—Si is in the native material

With 78.4% of the total studied articles sorted in this category, the use of Si as a native part of the investigated material was the leading category.

- 1a—Si is in the native material with a primary role

Within articles including Si as a native part of the material, 21.6% of the total (11 out of 51) articles placed silicon as a primary element of focus. The compositions of the investigated materials were variable with monocalcium-based inks [47,48], tricalcium-based inks [45,55]; glasses also involved [53,54]; elements such as magnesium [28–30], strontium [52] or lithium [56] were also core components of calcium–silicate materials. Controls were usually either an empty defect, β -TCP or titanium scaffolds. Only Touya et al. [45], using laser-assisted bioprinting in a mouse calvaria defect model, reported an absence of enhanced tissue mineralization despite encouraging in vitro results, whether associated with cells or not. Overall, the outcome was the improvement in bone repair compared to the control.

- 1b—Si is in the native material with a secondary role

The largest subcategory, including 56.8% of the total (29 out of 51) articles reviewed, could be divided into three main focuses: doping an existing scaffold, assessing a new material formula (in which Si is of minor interest for the authors) or investigating physical differences between scaffolds with the same composition. Scaffolds were doped by either organic, non-organic or mixed elements with coating or loading strategies.

Two articles implanted materials loaded with cells. Shen et al. [62] reported no significant difference in bone formation between loading or not their magnesium and calcium–silicate scaffold with bone marrow stromal cells. Wang et al. [74] used gingival fibroblast and observed an improved bone regeneration compared to their sole implants.

Plant-derived organic compounds [58,59,65], animal growth factors [60,63,64,73], osteopontin-derived peptide [61] and decellularized matrix [57] were investigated. Overall, they all triggered an enhanced bone regeneration compared to their respective non-loaded controls.

Most non-organic doping involved magnesium [67,69–72], while others included copper [44], strontium [66] or graphene [68]. All of the studies reported an improvement in bone regeneration associated with loaded materials compared to their controls.

In several studies [43,75–80], Si was part of the native material, but not considered as a determining factor in the bone repair evaluated. Although Meseguer et al. [78] only performed qualitative observations, all studies reported a bone repair enhancement.

For three studies, physical properties of the material assessed constituted the focus of the investigations: porosity [40,41] and surface texture [81] were highlighted to be determining parameters for bone repair response.

This category illustrates the use of Si as a structural/vehicle agent.

- Category 2—Si is an additive material

Among the scoped articles, 21.6% of the total were sorted in this category.

- *2a—Si is an additive material with a primary role*

Si was used as a determining additive material in 19.6% of total studied articles.

All but one of the articles in this category reported the use of Si as a doping agent [37–39,42,82–86] meant to be released through time in the implant micro-environment. Zhang et al. [46] presented the coating of a titanium scaffold with a bioglass. All articles reported an improved bone regeneration compared to their siliconless counterparts (for Zhang et al., at the periphery of the implant).

- *2b—Si is an additive material with a secondary role*

Only one (2% of total) article was sorted in this category [87], as the element of focus was a tri-molecule dexamethasone-FGF2-phenamil loading in a chitosan/bioglass-coated PCL scaffold. Silicon was associated to the coated bioglass on the PCL scaffold, and was one ingredient out of a vast association of doping agents. This study also reported an improved bone regeneration.

3.3.2. Quality Assessment and Risk of Bias

Results from the quality assessment of the studies selected for detailed analysis are shown in Figure 5.

All scoped articles were analyzed according to SYRCLE and ARRIVE 2.0 methods. As ARRIVE is, to date, not associated with any graphical representation, the performed quality assessment was depicted inspired by the SYRCLE display tool robvis [88].

According to SYRCLE evaluation, 86.5% of answers to each risk of bias were “Unclear” as the information needed was either missing or incomplete for most studies, while 11.5% were attributed as “Low” when information was unequivocal and 2% as “High”. If one or more item of any article was filled by a “High” potential risk of bias, the whole article was systematically considered to be also of “High” potential risk of bias, regardless of the element that led to the decision to attribute the initial “High”. Two categories were identified as most involved in sorting High risks of bias: the animal random housing (cat. 4) and the treatment of outcome data (cat. 8–9). Randomness of housing could not be ensured as it was not necessarily specified in many studies. Some studies presented differences between the number of animals used displayed in the methods section, and the number of animals displayed in the results section without justifying it.

With the ARRIVE 2.0 method, 75% of items were “Reported”, 25% were “Unclear” and only 1% were found to be “Not reported”; the categories with most missing or partially reported data were the inclusion and exclusion criteria, and the blinding.

Overall, the articles were found to be of satisfying quality but associated with risks of bias. However, those risks could be mostly attributed to a lack of information provided by authors rather than clearly misconducted experiments.

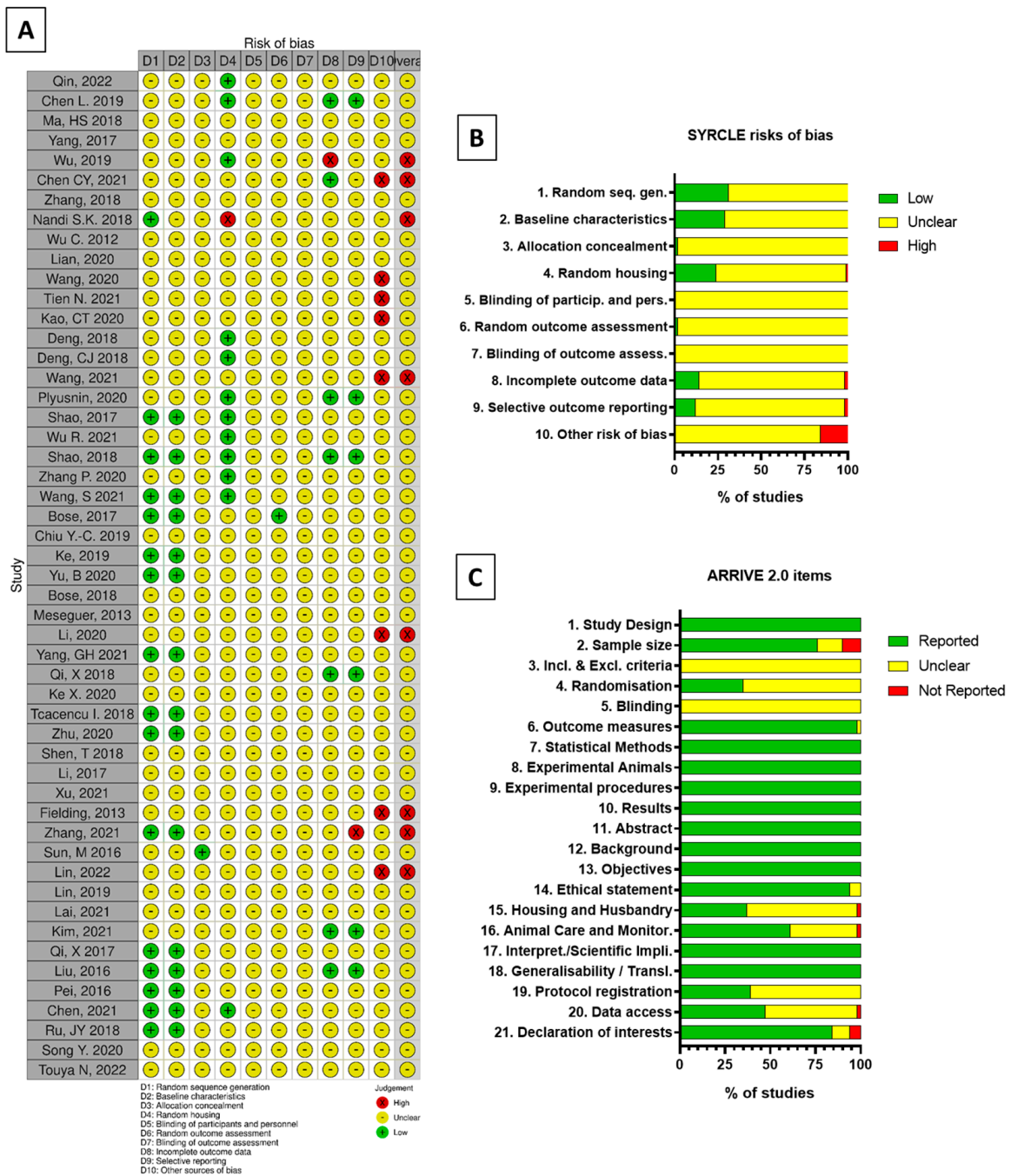


Figure 5. Visualizing risk of bias assessments of studied articles following (A,B) SYRCLC and (C) ARRIVE 2.0 guidelines with robvis tool.

4. Discussion

Silica-based materials exist in various forms, depending on the purity of sole Si, or complexation, resulting in a hybrid material. Even though Si was found in the literature to be part of natural metabolism and to benefit from a high renal clearance [89], some forms of silica may exert toxicity or deleterious effects at the scale of the whole organism [90,91]. None of the articles in this review seemed to employ such Si derivatives. Investigating the possibility to use Si as a drug delivery carrier, the size of 70 nm and below [92] of the Si particles applied to skin was found to be responsible for systemic exposure in mice and exerted mutagenic activity [93]. Even though such findings were consistent with the inhalation or digestion of such a size of nanoparticles [94,95], the literature insists on the good compatibility of these sizes with the dermal route even at a 2000 mg/kg dose [96].

In this review, the Si nanoparticles' smallest reported form was of 100 nm diameter [84], and no systemic effect was reported. However, Si content within the ink formulations investigated was unassessable due to the ink preparation process. Although the initial source and proportion of Si or Si-based derivatives within the material was indicated in many studies, the washing, drying and sintering steps contributed to affect the material mass or volume, and therefore the element's contents. Moreover, in different articles, the purpose of Si was to be released through time. Hence, measures of the native material's Si content regarding this strategy were irrelevant, and the focus on the outcome, i.e., the bone repair compared to appropriate controls, constituted the principal focus of this review.

Indeed, Si, beyond being cytocompatible, was reported to exert a bioactive effect, by enhancing angiogenesis in endothelial cells [97], and enhancing mineralization [98] in osteogenic lineages. These two critical events being tightly associated to an efficient bone repair, the direct impact of Si upon them was investigated.

However, other articles excluded from our scope used alternative strategies. For instance, in a study by Li et al. [99] (rejected for assessing only the subcutaneous implantation of material), the strategy relied on the support of activated and polarized macrophages to stimulate angiogenesis consecutive to bone defect creation. Mediated by Si ions, M2 macrophages were polarized. Associated with HUVEC, they significantly improved angiogenesis and enhanced bone repair subcutaneously. The immune system could therefore be a first order actor to modulate the tissue repair response after a trauma, of which silicon may offer a therapeutic interest.

With the emergence of biofabrication strategies for tissue engineering, the development of compatible materials on both technological and therapeutic aspects has increased, especially recently [23]. Indeed, more than half of the recovered articles through the algorithm were published in 2019 or later, highlighting the uprising place of material inks developed in bone tissue engineering. Among the initially gathered articles, 51 studies remained in the scope. The article sorting was designed in the perspective of best answering the original question "Which silica-based ink formulations have been shown effective for bone tissue regeneration?". Categories were designed to avoid duplicates, and no article was found to belong to multiple subcategories. This sorting could help decipher relevant trends of the use of Si in recent Si-based materials.

Indeed, it was outlined that in ~60% of articles, the role of silicon was not the determining aspect of the study. Overall, Si was considered as holding a structural role within printed materials. For the doped materials, when Si was often brought alongside with Zn, Mg or other elements, it was not possible to formally consider Si as the unique discriminated agent of bone repair enhancement, except for two studies. A trend of 96% of studies nevertheless reported a bone repair improvement in the formulations involving Si.

This review focused on 3D printing-associated materials. Although the printing of silicon is not new, its application essentially used to belong to the electronic [100], security [101] or glass [102] industries.

Overall, 80% of articles used the extrusion-based printing technique. This trend was found to be highly consistent with the outcome of a recent systematic review dedicated to hydrogel bioprinting [23] that found extrusion to be used in 76% of 393 articles. It also agreed to a previous review over the privileged place of extrusion [103], in spite of a huge difference between the percentage of each printing technique involved (also first rank with 36.18% of 351 articles), in which the presence of cells within the biomaterial was mandatory in the search algorithm. Extrusion seems then to be by far the gold standard technique in non-involving cells' strategies, which is consistent with the cells' sensitivity to shear stress and associated loss of viability [104]. Moreover, due to the low viscosity nature of most materials investigated here and the inherent constraints of ink deposition this low viscosity triggered, extrusion was the most relevant tool to perform an efficient, reproducible printing process. Overall, a very limited number of studies investigated the association of cells [45,62,74] to the Si-derived material as part of the engineered final product to implant, and most of the publications relied on the host response rather than an

enhanced biological activity due to additive cells. Only Wang et al. [74] found the addition of cells to their material to significantly improve bone formation.

In this review, the *in vivo* models investigated only concerned small animals. The rabbit appeared to be the most recurring target to assess bone repair, among other animal species or bone defects. This result goes against previous findings, as rat was reported by O’Loughlin et al. [105] (2008) to be the preferred model of fracture healing investigation. Some bone models possess analogous examples in humans or other species. Assessing various bones can therefore target a larger number of finer, physiologically equal models [106]. Hence, investigating the broadest range of animals and bones is crucial to provide an extensive and more truthful physiological bone response to implanted engineered biomaterials. However, in the effort to identify a baseline model to assess bone repair, thus providing a more standardized approach to enable comparison between studies and new materials, the diversity of animal and bone models might appear as a hurdle. The choice of a small animal model, beyond physiological fidelity, surgical accessibility or translation potential towards larger models, is associated with greater material advantages [107]. Indeed, smaller animals are more available and affordable in terms of basal caretaking costs *per capita* (purchase, housing, feeding, monitoring and overall costs of experiment-associated materials). Questioning here the bone regeneration potential of silica-based (bio)inks, the rabbit model appeared, hence, to be the most pragmatic and suitable model and logically federated the largest number of studies. Preclinical studies following the identification of the most outstanding materials regarding bone repair should consider the implantation in larger mammal models, as the studies presented here can only provide an *in vivo* first glimpse of a small model response.

Tightly bound to the animal species model choice, the baseline characteristics are also essential. Even though the outcome (a fully-filled, mature mineralized tissue with equal—if not superior—mechanical capacities regarding native tissue consecutively to creation of a bone defect) could be expected to be the major interest, the healing dynamics involved, the physiological performance and well-being of biological material over time should also be considered. In the scope of reaching the most reliable bone model to standardize the research of bone tissue engineering, extensive attention should then be brought with priority to the baseline characteristics of studied animals. First, the age of animals should be systematically reported, for this variable has a tight relationship with bone repair following a trauma [108,109]. Regarding gender, if fracture incidence was reported to be different through gender and age [110], there is no consensus in the literature regarding an influence of the sex over bone repair. Even though several studies in mice reported that males had a faster bone healing, they were unable to formally discriminate this result from the fact that studied males had more weight than females, or a superior activation of signaling pathways [111]. Overweight and obesity were indeed reported to delay and reduce bone healing post trauma [112,113].

To summarize, the age, weight and sex of animals should at least be reported systematically in each study. For example, as rabbit was the most abundant model in the articles scoped here (65% of total), it is proposed here to select specimens (either male or female) of 28–30 weeks of age for skeletal maturity [114,115] (specifically based on the growth plate closure age over life expectancy age), preferentially with homogeneous weights.

The choice of the defect location in animals is of major interest regarding healing dynamics through time. Each bone has its own indications for the creation of a defect [116], and studies may exhibit different approaches. Each model offers different relevant defects in terms of the physiological response and mechanical consequences, aiming or not for the creation of a critical-size defect [117]. For instance, flat bones were reported to heal same size defects faster than long bones [118]. Moreover, there seems to be an absence of consensus concerning the size of critical defects in humans [119], which adds challenge to the establishment of a universal defect for *in vivo* investigations. In this review, the question was to provide an extensive sight of the silica-derived inks regarding the enhancement of bone repair consecutive to the creation of a defect, beyond natural healing. Therefore,

although of great importance, the size of the defect here was not determining, and this review focused on the ink formulation employed and the final outcome compared to appropriate controls. In this review, the majority of defects were associated with long bones, especially the femur (51% of articles). Regarding the most representative animal used, femoral defects created in rabbit varied from 5×5 mm to 6×10 mm cylindrical defects (33.3% of total articles). The most abundant defects (6 out of 17 (11.7% of total articles)) were associated with a 6×6 mm size [59,60,64–66,80]. Thus, in the challenge of proposing a consensual model regarding the development of silica-based inks for bone repair, the prevalence of 6×6 mm cylindrical femoral defects in rabbits in this review should be highlighted.

It was challenging for bone repair assessment to be quantitatively compared through the screened articles due to the heterogeneity in animal/bone defect/healing time models. First, the most recurrent techniques displayed to qualitatively appreciate and quantitatively measure bone regeneration were, respectively, histological staining and micro-computed tomography (micro-CT). Indeed, 78% (40 out of 51) of articles investigated bone repair with both histology and micro-CT. Most of the time, histological analysis remained qualitative, and the tissue organization and interaction with the implanted/remodeled material were described and compared to controls. In this regard, outcomes presented in this review were limited to the quality of bone repair in the presence of silica-derived materials.

Regarding articles' quality and risk of bias, SYRACLE methodology highlighted a dramatic lack of animal procedure transparency and availability; ethical statements or animal procedures, as incorporated in studied articles, were unable to provide enough information to fill the required items. Most studies cited an ethical authority that provided an approval to conduct an in vivo experiment. However, until the full experimental procedure documents become available as a Supplementary File attached to any animal experiment-related publication, the tools for risk of bias detection will widely remain irrelevant. We hereby emphasize the absence of animal experiment-related protocols attached to publications. A better transparency will improve publications at many levels, especially in terms of the reliability and reproducibility of conducted experiments. Unfortunately, likely due to potential patents and/or the intellectual property involved with publications, most of the animal procedure complete protocols remain unavailable, and therefore the displayed elements within most manuscripts cannot be considered as whole.

Concerning the regeneration process, the immune status of the animal model was questioned. It was considered that, in animals with an altered immune system, the conclusions of observed results could be inconsistent with a normal physiological response involving immune system key mechanisms [120,121]. Therefore, studies with immune-compromised animals were categorized as having an "Unclear" risk of bias.

Overall, although of great interest, the SYRACLE risk of bias assessment seemed not to represent the best tool to judge the quality of studies assessing the development of material formulations, for a majority of blinding-related aspects were conflictual with the implantation of a material versus an empty defect. ARRIVE 2.0 methodology was perceived as the opposite of SYRACLE regarding the proportion of items found to meet the requirement of the guidelines with the reported/unclear/not reported system. However, this scoring was not able to underline the weaknesses of some studies. For example, an inappropriate methodology employed regarding statistical hypotheses and tests could be performed in an article, or conflicts of interests could be displayed. According to the scoring system, the items 7-Statistical Methods and 21-declaration of interests would be considered reported and, consequently, provide a pledge to quality.

In spite of aiming for a single purpose, bone repair, this review highlighted the plurality in strategies: from the scaffold/ink preparation process to the delivery of the material. Most studies involved processes with several intermediary steps such as soaking, drying, sintering, etc., to generate a scaffold, while few were able to deliver a final product by one-step assembling and in situ printing [43,45]. Although the tissue engineering definition [122] depicted a trinity involving cells, adjuvants and support materials, almost

none of the articles here investigated focused on a strategy relying on the use of cells, and most used an inorganic material-associated approach. This is consistent with a pragmatic will of obtaining a standardized, patient adjustable, quickly available elaborated material.

This manufacturing aspect raises the question of the materials' availability for patients regarding the acceptable delay from the moment of demand versus the moment of delivery. Moreover, the questions about the strategy underlying the formulation are crucial, for the materials can be supposed to immediately replace a bone on a mechanical perspective with poor physiological respect, or to be associated with a longer (closer to natural) healing time but aim to restore the bone tissue as if it was native. Still regarding formulation, targeted physiological aspects can be crucial, choosing to stimulate vascularization, mineralization and innervation, or to first prevent a microbiological contamination hazard while keeping the composition as simple as possible, with a defined architecture and physicochemical properties expected to address physiologically-specific needs.

From a translation-to-clinic perspective, the manufacturing of new materials must therefore overcome considerable challenges. The scale up from the *in vitro* evaluation of materials with *in vivo* assessment in small animal models to *in vivo* therapeutic implantation to large mammals with respect to the laws and regulations for health seems yet to remain for a minority of products [123,124]. The increasing number and diversity of 3D printing approaches this last decade might help to bring more materials and applications to the clinic, and research should be continued in this effort.

5. Conclusions

Involved in bone tissue repair strategies since the 1970s, silicon and its derivatives recently grew in interest in the additive manufacturing and bioprinting fields. In this review, silicon appeared to be a versatile element to improve bone repair, whether as a constitutive or as a functionalizing, additive element. This review highlighted the dominant place of extrusion printing and the privileged place of rabbit and the femur, respectively, as animal and bone defect models for bone tissue engineering regarding the development of biocompatible inks suited for 3D printing. Considering the trend of an increasing number of publications related to the *in vivo* application of silica-derived inks for bone tissue engineering, it is expected that future printed patient-designed prostheses will integrate Si within the manufacturing process.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/bioengineering9080388/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, O.K.; methodology, O.K.; software, A.N.; validation, A.W., C.K. and Y.T.; formal analysis, R.D.; investigation, N.T.; resources, N.T. and O.K.; data curation, N.T. and O.K.; writing—original draft preparation, N.T.; writing—review and editing, O.K.; visualization, N.T.; supervision, O.K.; project administration, O.K.; funding acquisition, O.K. and R.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This international collaboration between French and Japanese research teams is part of a more global research project funded by the JSPS (Japan Society for the Promotion of Science), the Foundation ARC (French Foundation on Cancer Research), the French Embassy in Japan (“Exploration Japon” Program) and IdEX—University of Bordeaux (Initiative of Excellence). The Japan Society for the Promotion of Science—ID No. P22101—17 December 2021. The foundation ARC-n° ARCMOB2021080004095—14 December 2021. The French Embassy in Japan—“Exploration Japon” Program-18 February 2020. IdEX—University of Bordeaux-n°191203_001—3 February 2020.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data gathered for this review were obtained from the scoped and cited articles. No new data were created or analyzed in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Hernigou, P.; Scarlat, M.M. Growth in Musculoskeletal Pathology Worldwide: The Role of Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie and Publications. *Int. Orthop. (SICOT)* **2022**, *46*, 1913–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Porter, J.R.; Ruckh, T.T.; Papat, K.C. Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 1539–1560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- García-Gareta, E.; Coathup, M.J.; Blunn, G.W. Osteoinduction of Bone Grafting Materials for Bone Repair and Regeneration. *Bone* **2015**, *81*, 112–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hench, L.L.; Polak, J.M. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* **2002**, *295*, 1014–1017. [[CrossRef](#)]
- Hench, L.L.; Splinter, R.J.; Allen, W.C.; Greenlee, T.K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, *5*, 117–141. [[CrossRef](#)]
- Götz, W.; Tobiasch, E.; Witzleben, S.; Schulze, M. Effects of Silicon Compounds on Biomineralization, Osteogenesis, and Hard Tissue Formation. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 117. [[CrossRef](#)]
- Vallet-Regí, M.; Balas, F. Silica Materials for Medical Applications. *Open Biomed. Eng. J.* **2008**, *2*, 1–9. [[CrossRef](#)]
- Clarke, F.W.; Washington, H.S. The Composition of the Earth's Crust. *Prof. Pap.* **1924**. [[CrossRef](#)]
- Jugdaohsingh, R. Silicon and Bone Health. *J. Nutr. Health Aging* **2007**, *11*, 99–110.
- Schwarz, K. A Bound Form of Silicon in Glycosaminoglycans and Polyuronides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 1608–1612. [[CrossRef](#)]
- Carlisle, E.M. Silicon: A Possible Factor in Bone Calcification. *Science* **1970**, *167*, 279–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schwarz, K.; Milne, D.B. Growth-Promoting Effects of Silicon in Rats. *Nature* **1972**, *239*, 333–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gao, T.; Aro, H.T.; Ylänen, H.; Vuorio, E. Silica-Based Bioactive Glasses Modulate Expression of Bone Morphogenetic Protein-2 mRNA in Saos-2 Osteoblasts in Vitro. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1475–1483. [[CrossRef](#)]
- Reffitt, D.M.; Ogston, N.; Jugdaohsingh, R.; Cheung, H.F.J.; Evans, B.A.J.; Thompson, R.P.H.; Powell, J.J.; Hampson, G.N. Orthosilicic Acid Stimulates Collagen Type 1 Synthesis and Osteoblastic Differentiation in Human Osteoblast-like Cells in Vitro. *Bone* **2003**, *32*, 127–135. [[CrossRef](#)]
- Hench, L.L. 10—Biological Implications. In *Sol-Gel Silica*; Hench, L.L., Ed.; William Andrew Publishing: Westwood, NJ, USA, 1998; pp. 117–132; ISBN 978-0-8155-1419-0.
- Hott, M.; de Pollak, C.; Modrowski, D.; Marie, P.J. Short-Term Effects of Organic Silicon on Trabecular Bone in Mature Ovariectomized Rats. *Calcif. Tissue Int.* **1993**, *53*, 174–179. [[CrossRef](#)]
- Hielsen, F.H.; Poellot, R. Dietary Silicon Affects Bone Turnover Differently in Ovariectomized and Sham-Operated Growing Rats. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **2004**, *17*, 137–149. [[CrossRef](#)]
- Zhou, X.; Zhang, N.; Mankoci, S.; Sahai, N. Silicates in Orthopedics and Bone Tissue Engineering Materials. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2017**, *105*, 2090–2102. [[CrossRef](#)]
- Korpela, M.; Riikonen, N.; Piili, H.; Salminen, A.; Nyrrhilä, O. Additive manufacturing—Past, present, and the future. In *Technical, Economic and Societal Effects of Manufacturing 4.0: Automation, Adaption and Manufacturing in Finland and Beyond*; Collan, M., Michelsen, K.-E., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; pp. 17–41; ISBN 978-3-030-46103-4.
- Qu, H. Additive Manufacturing for Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Mater. Today Commun.* **2020**, *24*, 101024. [[CrossRef](#)]
- Naveau, A.; Smirani, R.; Catros, S.; De Oliveira, H.; Fricain, J.-C.; Devillard, R. A Bibliometric Study to Assess Bioprinting Evolution. *Appl. Sci.* **2017**, *7*, 1331. [[CrossRef](#)]
- Yu, X.; Tang, X.; Gohil, S.V.; Laurencin, C.T. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1268–1285. [[CrossRef](#)]
- Pedroza-González, S.C.; Rodríguez-Salvador, M.; Pérez-Benítez, B.E.; Alvarez, M.M.; Santiago, G.T. Bioinks for 3D Bioprinting: A Scientometric Analysis of Two Decades of Progress. *Int. J. Bioprinting* **2021**, *7*, 333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Sol-Gel Silica-Based Biomaterials and Bone Tissue Regeneration. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2874–2888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Khan, A.F.; Saleem, M.; Afzal, A.; Ali, A.; Khan, A.; Khan, A.R. Bioactive Behavior of Silicon Substituted Calcium Phosphate Based Bioceramics for Bone Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *35*, 245–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Al-Harbi, N.; Mohammed, H.; Al-Hadeethi, Y.; Bakry, A.S.; Umar, A.; Hussein, M.A.; Abbassy, M.A.; Vaidya, K.G.; Berakdar, G.A.; Mkawi, E.M.; et al. Silica-Based Bioactive Glasses and Their Applications in Hard Tissue Regeneration: A Review. *Pharmaceutics* **2021**, *14*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wu, X.; Walsh, K.; Hoff, B.L.; Camci-Unal, G. Mineralization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Bioengineering* **2020**, *7*, 132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, C.; Huang, W.; Zhou, Y.; He, L.; He, Z.; Chen, Z.; He, X.; Tian, S.; Liao, J.; Lu, B.; et al. 3D Printing of Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Bioact. Mater.* **2020**, *5*, 82–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Han, Y.; Wei, Q.; Chang, P.; Hu, K.; Okoro, O.V.; Shavandi, A.; Nie, L. Three-Dimensional Printing of Hydroxyapatite Composites for Biomedical Application. *Crystals* **2021**, *11*, 353. [[CrossRef](#)]

30. Marques, C.F.; Diogo, G.S.; Pina, S.; Oliveira, J.M.; Silva, T.H.; Reis, R.L. Collagen-Based Bioinks for Hard Tissue Engineering Applications: A Comprehensive Review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30*, 32. [[CrossRef](#)]
31. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *Syst. Rev.* **2021**, *10*, 89. [[CrossRef](#)]
32. Huang, X.; Lin, J.; Demner-Fushman, D. Evaluation of PICO as a Knowledge Representation for Clinical Questions. *AMIA Annu. Symp. Proc.* **2006**, *2006*, 359–363.
33. Minamikawa, Y.; Peimer, C.A.; Ogawa, R.; Howard, C.; Sherwin, F.S. In Vivo Experimental Analysis of Silicone Implants on Bone and Soft Tissue. *J. Hand Surg. Am.* **1994**, *19*, 575–583. [[CrossRef](#)]
34. Waltman, L.; van Eck, N.J.; Noyons, E.C.M. A Unified Approach to Mapping and Clustering of Bibliometric Networks. *J. Informetr.* **2010**, *4*, 629–635. [[CrossRef](#)]
35. Percie du Sert, N.; Hurst, V.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Baker, M.; Browne, W.J.; Clark, A.; Cuthill, I.C.; Dirnagl, U.; et al. The ARRIVE Guidelines 2.0: Updated Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000410. [[CrossRef](#)]
36. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Available online: <https://training.cochrane.org/handbook> (accessed on 8 June 2022).
37. Bose, S.; Tarafder, S.; Bandyopadhyay, A. Effect of Chemistry on Osteogenesis and Angiogenesis Towards Bone Tissue Engineering Using 3D Printed Scaffolds. *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45*, 261–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bose, S.; Banerjee, D.; Robertson, S.; Vahabzadeh, S. Enhanced In Vivo Bone and Blood Vessel Formation by Iron Oxide and Silica Doped 3D Printed Tricalcium Phosphate Scaffolds. *Ann. Biomed. Eng.* **2018**, *46*, 1241–1253. [[CrossRef](#)]
39. Nandi, S.K.; Fielding, G.; Banerjee, D.; Bandyopadhyay, A.; Bose, S. 3D Printed β -TCP Bone Tissue Engineering Scaffolds: Effects of Chemistry on in Vivo Biological Properties in a Rabbit Tibia Model. *J. Mater. Res.* **2018**, *33*, 1939–1947. [[CrossRef](#)]
40. Wu, R.; Li, Y.; Shen, M.; Yang, X.; Zhang, L.; Ke, X.; Yang, G.; Gao, C.; Gou, Z.; Xu, S. Bone Tissue Regeneration: The Role of Finely Tuned Pore Architecture of Bioactive Scaffolds before Clinical Translation. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 1242–1254. [[CrossRef](#)]
41. Qin, H.; Wei, Y.; Han, J.; Jiang, X.; Yang, X.; Wu, Y.; Gou, Z.; Chen, L. 3D Printed Bioceramic Scaffolds: Adjusting Pore Dimension Is Beneficial for Mandibular Bone Defects Repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2022**, *16*, 409–421. [[CrossRef](#)]
42. Yang, G.H.; Yeo, M.; Choi, E.; Kang, D.; Kim, M.; Nam, Y.; Gwak, S.-J.; Yoo, H.H.; Park, M.-J.; Jung, B.; et al. Investigating the Physical Characteristics and Cellular Interplay on 3D-Printed Scaffolds Depending on the Incorporated Silica Size for Hard Tissue Regeneration. *Mater. Des.* **2021**, *207*, 109866. [[CrossRef](#)]
43. Li, C.; Hao, W.; Wu, C.; Li, W.; Tao, J.; Ai, F.; Xin, H.; Wang, X. Injectable and Bioactive Bone Cement with Moderate Setting Time and Temperature Using Borosilicate Bio-Glass-Incorporated Magnesium Phosphate. *Biomed. Mater.* **2020**, *15*, 045015. [[CrossRef](#)]
44. Lian, M.; Han, Y.; Sun, B.; Xu, L.; Wang, X.; Ni, B.; Jiang, W.; Qiao, Z.; Dai, K.; Zhang, X. A Multifunctional Electrowritten Bi-Layered Scaffold for Guided Bone Regeneration. *Acta Biomater.* **2020**, *118*, 83–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Touya, N.; Devun, M.; Handschin, C.; Casenave, S.; Ahmed Omar, N.; Gaubert, A.; Dusserre, N.; De Oliveira, H.; Kérourédan, O.; Devillard, R. In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Tricalcium Silicate-Based Ink for Bone Regeneration Using Laser-Assisted Bioprinting. *Biofabrication* **2022**, *14*, 024104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhang, G.; Zhao, P.; Lin, L.; Qin, L.; Huan, Z.; Leeﬂang, S.; Zadpoor, A.A.; Zhou, J.; Wu, L. Surface-Treated 3D Printed Ti-6Al-4V Scaffolds with Enhanced Bone Regeneration Performance: An in Vivo Study. *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ma, H.; Li, T.; Huan, Z.; Zhang, M.; Yang, Z.; Wang, J.; Chang, J.; Wu, C. 3D Printing of High-Strength Bioscaffolds for the Synergistic Treatment of Bone Cancer. *NPG Asia Mater.* **2018**, *10*, 31–44. [[CrossRef](#)]
48. Wu, C.; Fan, W.; Zhou, Y.; Luo, Y.; Gelinsky, M.; Chang, J.; Xiao, Y. 3D-Printing of Highly Uniform CaSiO₃ Ceramic Scaffolds: Preparation, Characterization and in Vivo Osteogenesis. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 12288–12295. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, Y.; Yu, W.; Ba, Z.; Cui, S.; Wei, J.; Li, H. 3D-Printed Scaffolds of Mesoporous Bioglass/Gliadin/Polycaprolactone Ternary Composite for Enhancement of Compressive Strength, Degradability, Cell Responses and New Bone Tissue Ingrowth. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 5433–5447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Shao, H.; Ke, X.; Liu, A.; Sun, M.; He, Y.; Yang, X.; Fu, J.; Liu, Y.; Zhang, L.; Yang, G.; et al. Bone Regeneration in 3D Printing Bioactive Ceramic Scaffolds with Improved Tissue/Material Interface Pore Architecture in Thin-Wall Bone Defect. *Biofabrication* **2017**, *9*, 025003. [[CrossRef](#)]
51. Wang, S.; Huang, Z.; Liu, L.; Shi, Z.; Liu, J.J.J.; Li, Z.; Hao, Y. Design and Study of in Vivo Bone Formation Characteristics of Biodegradable Bioceramic. *Mater. Des.* **2021**, *212*, 110242. [[CrossRef](#)]
52. Deng, C.; Zhu, H.; Li, J.; Feng, C.; Yao, Q.; Wang, L.; Chang, J.; Wu, C. Bioactive Scaffolds for Regeneration of Cartilage and Subchondral Bone Interface. *Theranostics* **2018**, *8*, 1940–1955. [[CrossRef](#)]
53. Qi, X.; Wang, H.; Zhang, Y.; Pang, L.; Xiao, W.; Jia, W.; Zhao, S.; Wang, D.; Huang, W.; Wang, Q. Mesoporous Bioactive Glass-Coated 3D Printed Borosilicate Bioactive Glass Scaffolds for Improving Repair of Bone Defects. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14*, 471–484. [[CrossRef](#)]
54. Qi, X.; Pei, P.; Zhu, M.; Du, X.; Xin, C.; Zhao, S.; Li, X.; Zhu, Y. Three Dimensional Printing of Calcium Sulfate and Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds for Improving Bone Regeneration in Vitro and in Vivo. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pei, P.; Qi, X.; Du, X.; Zhu, M.; Zhao, S.; Zhu, Y. Three-Dimensional Printing of Tricalcium Silicate/Mesoporous Bioactive Glass Cement Scaffolds for Bone Regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 7452–7463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Chen, L.; Deng, C.; Li, J.; Yao, Q.; Chang, J.; Wang, L.; Wu, C. 3D Printing of a Lithium-Calcium-Silicate Crystal Bioscaffold with Dual Bioactivities for Osteochondral Interface Reconstruction. *Biomaterials* **2019**, *196*, 138–150. [[CrossRef](#)]
57. Wu, Y.-H.A.; Chiu, Y.-C.; Lin, Y.-H.; Ho, C.-C.; Shie, M.-Y.; Chen, Y.-W. 3D-Printed Bioactive Calcium Silicate/Poly- ϵ -Caprolactone Bioscaffolds Modified with Biomimetic Extracellular Matrices for Bone Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 942. [[CrossRef](#)]
58. Chen, C.-Y.; Shie, M.-Y.; Lee, A.K.-X.; Chou, Y.-T.; Chiang, C.; Lin, C.-P. 3D-Printed Ginsenoside Rb1-Loaded Mesoporous Calcium Silicate/Calcium Sulfate Scaffolds for Inflammation Inhibition and Bone Regeneration. *Biomedicines* **2021**, *9*, 907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Tien, N.; Lee, J.-J.; Lee, A.K.-X.; Lin, Y.-H.; Chen, J.-X.; Kuo, T.-Y.; Shie, M.-Y. Additive Manufacturing of Caffeic Acid-Inspired Mineral Trioxide Aggregate/Poly- ϵ -Caprolactone Scaffold for Regulating Vascular Induction and Osteogenic Regeneration of Dental Pulp Stem Cells. *Cells* **2021**, *10*, 2911. [[CrossRef](#)]
60. Kao, C.-T.; Chen, Y.-J.; Huang, T.-H.; Lin, Y.-H.; Hsu, T.-T.; Ho, C.-C. Assessment of the Release Profile of Fibroblast Growth Factor-2-Load Mesoporous Calcium Silicate/Poly- ϵ -Caprolactone 3D Scaffold for Regulate Bone Regeneration. *Processes* **2020**, *8*, 1249. [[CrossRef](#)]
61. Zhu, M.; He, H.; Meng, Q.; Zhu, Y.; Ye, X.; Xu, N.; Yu, J. Osteopontin Sequence Modified Mesoporous Calcium Silicate Scaffolds to Promote Angiogenesis in Bone Tissue Re.egeneration. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 5849–5861. [[CrossRef](#)]
62. Shen, T.; Dai, Y.; Li, X.; Xu, S.; Gou, Z.; Gao, C. Regeneration of the Osteochondral Defect by a Wollastonite and Macroporous Fibrin Biphasic Scaffold. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 1942–1953. [[CrossRef](#)]
63. Li, C.; Jiang, C.; Deng, Y.; Li, T.; Li, N.; Peng, M.; Wang, J. RhBMP-2 Loaded 3D-Printed Mesoporous Silica/Calcium Phosphate Cement Porous Scaffolds with Enhanced Vascularization and Osteogenesis Properties. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41331. [[CrossRef](#)]
64. Lai, W.-Y.; Chen, Y.-J.; Lee, A.K.-X.; Lin, Y.-H.; Liu, Y.-W.; Shie, M.-Y. Therapeutic Effects of the Addition of Fibroblast Growth Factor-2 to Biodegradable Gelatin/Magnesium-Doped Calcium Silicate Hybrid 3D-Printed Scaffold with Enhanced Osteogenic Capabilities for Critical Bone Defect Restoration. *Biomedicines* **2021**, *9*, 712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Ru, J.; Wei, Q.; Yang, L.; Qin, J.; Tang, L.; Wei, J.; Guo, L.; Niu, Y. Zein Regulating Apatite Mineralization, Degradability, in Vitro Cells Responses and in Vivo Osteogenesis of 3D-Printed Scaffold of n-MS/ZN/PCL Ternary Composite. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 18745–18756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Chiu, Y.-C.; Shie, M.-Y.; Lin, Y.-H.; Lee, A.K.-X.; Chen, Y.-W. Effect of Strontium Substitution on the Physicochemical Properties and Bone Regeneration Potential of 3D Printed Calcium Silicate Scaffolds. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lin, Y.-H.; Lee, A.K.-X.; Ho, C.-C.; Fang, M.-J.; Kuo, T.-Y.; Shie, M.-Y. The Effects of a 3D-Printed Magnesium-/Strontium-Doped Calcium Silicate Scaffold on Regulation of Bone Regeneration via Dual-Stimulation of the AKT and WNT Signaling Pathways. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2022**, *133*, 112660. [[CrossRef](#)]
68. Lin, Y.-H.; Chuang, T.-Y.; Chiang, W.-H.; Chen, I.-W.P.; Wang, K.; Shie, M.-Y.; Chen, Y.-W. The Synergistic Effects of Graphene-Contained 3D-Printed Calcium Silicate/Poly- ϵ -Caprolactone Scaffolds Promote FGFR-Induced Osteogenic/Angiogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2019**, *104*, 109887. [[CrossRef](#)]
69. Ke, X.; Qiu, J.; Wang, X.; Yang, X.; Shen, J.; Ye, S.; Yang, G.; Xu, S.; Bi, Q.; Gou, Z.; et al. Modification of Pore-Wall in Direct Ink Writing Wollastonite Scaffolds Favorable for Tuning Biodegradation and Mechanical Stability and Enhancing Osteogenic Capability. *FASEB J.* **2020**, *34*, 5673–5687. [[CrossRef](#)]
70. Sun, M.; Liu, A.; Shao, H.; Yang, X.; Ma, C.; Yan, S.; Liu, Y.; He, Y.; Gou, Z. Systematical Evaluation of Mechanically Strong 3D Printed Diluted Magnesium Doping Wollastonite Scaffolds on Osteogenic Capacity in Rabbit Calvarial Defects. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34029. [[CrossRef](#)]
71. Chen, Y.; Huang, J.; Liu, J.; Wei, Y.; Yang, X.; Lei, L.; Chen, L.; Wu, Y.; Gou, Z. Tuning Filament Composition and Microstructure of 3D-Printed Bioceramic Scaffolds Facilitate Bone Defect Regeneration and Repair. *Regen. Biomater.* **2021**, *8*, rbab007. [[CrossRef](#)]
72. Shao, H.; Sun, M.; Zhang, F.; Liu, A.; He, Y.; Fu, J.; Yang, X.; Wang, H.; Gou, Z. Custom Repair of Mandibular Bone Defects with 3D Printed Bioceramic Scaffolds. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 68–76. [[CrossRef](#)]
73. Wang, H.; Deng, Z.; Chen, J.; Qi, X.; Pang, L.; Lin, B.; Adib, Y.T.Y.; Miao, N.; Wang, D.; Zhang, Y.; et al. A Novel Vehicle-like Drug Delivery 3D Printing Scaffold and Its Applications for a Rat Femoral Bone Repairing in Vitro and in Vivo. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 1821–1832. [[CrossRef](#)]
74. Wang, C.-Y.; Chiu, Y.-C.; Lee, A.K.-X.; Lin, Y.-A.; Lin, P.-Y.; Shie, M.-Y. Biofabrication of Gingival Fibroblast Cell-Laden Collagen/Strontium-Doped Calcium Silicate 3D-Printed Bi-Layered Scaffold for Osteoporotic Periodontal Regeneration. *Biomedicines* **2021**, *9*, 431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Deng, C.; Yang, Q.; Sun, X.; Chen, L.; Feng, C.; Chang, J.; Wu, C. Bioactive Scaffolds with Li and Si Ions-Synergistic Effects for Osteochondral Defects Regeneration. *Appl. Mater. Today* **2018**, *10*, 203–216. [[CrossRef](#)]
76. Zhang, P.; Yang, K.; Zhou, Z.; Zhu, X.; Li, W.; Cao, C.; Zhou, K.; Liao, L.; Ai, F. Customized Borosilicate Bioglass Scaffolds With Excellent Biodegradation and Osteogenesis for Mandible Reconstruction. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 610284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Yu, B.; Fu, S.; Kang, Z.; Zhu, M.; Ding, H.; Luo, T.; Zhu, Y.; Zhang, Y. Enhanced Bone Regeneration of 3D Printed β -Ca₂SiO₄ Scaffolds by Aluminum Ions Solid Solution. *Ceram. Int.* **2020**, *46*, 7783–7791. [[CrossRef](#)]
78. Meseguer-Olmo, L.; Vicente-Ortega, V.; Alcaraz-Baños, M.; Calvo-Guirado, J.L.; Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Baeza, A. In-Vivo Behavior of Si-Hydroxyapatite/Polycaprolactone/DMB Scaffolds Fabricated by 3D Printing. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 2038–2048. [[CrossRef](#)]

79. Tcacencu, I.; Rodrigues, N.; Alharbi, N.; Benning, M.; Toumpaniari, S.; Mancuso, E.; Marshall, M.; Bretcanu, O.; Birch, M.; McCaskie, A.; et al. Osseointegration of Porous Apatite-Wollastonite and Poly(Lactic Acid) Composite Structures Created Using 3D Printing Techniques. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *90*, 1–7. [[CrossRef](#)]
80. Liu, A.; Sun, M.; Yang, X.; Ma, C.; Liu, Y.; Yang, X.; Yan, S.; Gou, Z. Three-Dimensional Printing Akermanite Porous Scaffolds for Load-Bearing Bone Defect Repair: An Investigation of Osteogenic Capability and Mechanical Evolution. *J. Biomater. Appl.* **2016**, *31*, 650–660. [[CrossRef](#)]
81. Yang, C.; Wang, X.; Ma, B.; Zhu, H.; Huan, Z.; Ma, N.; Wu, C.; Chang, J. 3D-Printed Bioactive Ca₃SiO₅ Bone Cement Scaffolds with Nano Surface Structure for Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 5757–5767. [[CrossRef](#)]
82. Plyusnin, A.; Kulkova, J.; Arthurs, G.; Jalava, N.; Uppstu, P.; Moritz, N. Biological Response to an Experimental Implant for Tibial Tuberosity Advancement in Dogs: A Pre-Clinical Study. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *128*, 183–196. [[CrossRef](#)]
83. Ke, D.; Tarafder, S.; Vahabzadeh, S.; Bose, S. Effects of MgO, ZnO, SrO, and SiO₂ in Tricalcium Phosphate Scaffolds on in Vitro Gene Expression and in Vivo Osteogenesis. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2019**, *96*, 10–19. [[CrossRef](#)]
84. Xu, C.; Chang, Y.; Xu, Y.; Wu, P.; Mu, C.; Nie, A.; Qu, Y.; Duan, D.; Guo, X.; Liu, Z.; et al. Silicon-Phosphorus-Nanosheets-Integrated 3D-Printable Hydrogel as a Bioactive and Biodegradable Scaffold for Vascularized Bone Regeneration. *Adv. Healthc. Mater.* **2022**, *11*, e2101911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Fielding, G.; Bose, S. SiO₂ and ZnO Dopants in Three-Dimensionally Printed Tricalcium Phosphate Bone Tissue Engineering Scaffolds Enhance Osteogenesis and Angiogenesis in Vivo. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 9137–9148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Song, Y.; Wu, H.; Gao, Y.; Li, J.; Lin, K.; Liu, B.; Lei, X.; Cheng, P.; Zhang, S.; Wang, Y.; et al. Zinc Silicate/Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds Promote Angiogenesis and Bone Regeneration via the P38 MAPK Pathway in Activated Monocytes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 16058–16075. [[CrossRef](#)]
87. Kim, H.-S.; Lee, J.-H.; Mandakhbayar, N.; Jin, G.-Z.; Kim, S.-J.; Yoon, J.-Y.; Jo, S.B.; Park, J.-H.; Singh, R.K.; Jang, J.-H.; et al. Therapeutic Tissue Regenerative Nanohybrids Self-Assembled from Bioactive Inorganic Core/Chitosan Shell Nanounits. *Biomaterials* **2021**, *274*, 120857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. McGuinness, L.A.; Higgins, J.P.T. Risk-of-Bias VISualization (Robvis): An R Package and Shiny Web App for Visualizing Risk-of-Bias Assessments. *Res. Synth. Methods* **2021**, *12*, 55–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Reffitt, D.M.; Jugdaohsingh, R.; Thompson, R.P.; Powell, J.J. Silicic Acid: Its Gastrointestinal Uptake and Urinary Excretion in Man and Effects on Aluminium Excretion. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *76*, 141–147. [[CrossRef](#)]
90. Croissant, J.G.; Butler, K.S.; Zink, J.I.; Brinker, C.J. Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles: Toxicity, Biomedical and Environmental Implications. *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 886–909. [[CrossRef](#)]
91. Chen, L.; Liu, J.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Kang, Y.; Chen, A.; Feng, X.; Shao, L. The Toxicity of Silica Nanoparticles to the Immune System. *Nanomedicine* **2018**, *13*, 1939–1962. [[CrossRef](#)]
92. Hudson, S.; Padera, R.F.; Langer, R.; Kohane, D.S. The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4045–4055. [[CrossRef](#)]
93. Nabeshi, H.; Yoshikawa, T.; Matsuyama, K.; Nakazato, Y.; Matsuo, K.; Arimori, A.; Isobe, M.; Tochigi, S.; Kondoh, S.; Hirai, T.; et al. Systemic Distribution, Nuclear Entry and Cytotoxicity of Amorphous Nanosilica Following Topical Application. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2713–2724. [[CrossRef](#)]
94. Berg, J.M.; Romoser, A.A.; Figueroa, D.E.; Spencer West, C.; Sayes, C.M. Comparative Cytological Responses of Lung Epithelial and Pleural Mesothelial Cells Following in Vitro Exposure to Nanoscale SiO₂. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 24–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Sergent, J.-A.; Paget, V.; Chevillard, S. Toxicity and Genotoxicity of Nano-SiO₂ on Human Epithelial Intestinal HT-29 Cell Line. *Ann. Occup. Hyg.* **2012**, *56*, 622–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Ryu, H.J.; Seong, N.; So, B.J.; Seo, H.; Kim, J.; Hong, J.-S.; Park, M.; Kim, M.-S.; Kim, Y.-R.; Cho, K.-B.; et al. Evaluation of Silica Nanoparticle Toxicity after Topical Exposure for 90 Days. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 127–136. [[CrossRef](#)]
97. Monte, F.; Cebe, T.; Ripperger, D.; Ighani, F.; Kojouharov, H.V.; Chen, B.M.; Kim, H.K.W.; Aswath, P.B.; Varanasi, V.G. Ionic Silicon Improves Endothelial Cells' Survival under Toxic Oxidative Stress by Overexpressing Angiogenic Markers and Antioxidant Enzymes. *J. Tissue Eng. Regen Med.* **2018**, *12*, 2203–2220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Kim, E.-J.; Bu, S.-Y.; Sung, M.-K.; Choi, M.-K. Effects of Silicon on Osteoblast Activity and Bone Mineralization of MC3T3-E1 Cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **2013**, *152*, 105–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Li, T.; Peng, M.; Yang, Z.; Zhou, X.; Deng, Y.; Jiang, C.; Xiao, M.; Wang, J. 3D-Printed IFN- γ -Loading Calcium Silicate- β -Tricalcium Phosphate Scaffold Sequentially Activates M1 and M2 Polarization of Macrophages to Promote Vascularization of Tissue Engineering Bone. *Acta Biomater.* **2018**, *71*, 96–107. [[CrossRef](#)]
100. Samimi Garaie, S.; Seyfoori, A.; Khun Jush, B.; Zhou, X.; Pagan, E.; Godau, B.; Akbari, M. Silicate-Based Electro-Conductive Inks for Printing Soft Electronics and Tissue Engineering. *Gels* **2021**, *7*, 240. [[CrossRef](#)]
101. Nair, K.S.; Abhilash, P.; Surendran, K.P. Silica-Based Organic-Inorganic Hybrid Fluorescent Ink for Security Applications. *ACS Omega* **2019**, *4*, 2577–2583. [[CrossRef](#)]
102. Cooperstein, I.; Shukrun, E.; Press, O.; Kamyshny, A.; Magdassi, S. Additive Manufacturing of Transparent Silica Glass from Solutions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 18879–18885. [[CrossRef](#)]
103. Ng, W.L.; Chua, C.K.; Shen, Y.-F. Print Me An Organ! Why We Are Not There Yet. *Prog. Polym. Sci.* **2019**, *97*, 101145. [[CrossRef](#)]

104. Boularaoui, S.; Al Hussein, G.; Khan, K.A.; Christoforou, N.; Stefanini, C. An Overview of Extrusion-Based Bioprinting with a Focus on Induced Shear Stress and Its Effect on Cell Viability. *Bioprinting* **2020**, *20*, e00093. [[CrossRef](#)]
105. O'Loughlin, P.F.; Morr, S.; Bogunovic, L.; Kim, A.D.; Park, B.; Lane, J.M. Selection and Development of Preclinical Models in Fracture-Healing Research. *J. Bone Jt. Surg.* **2008**, *90* (Suppl. S1), 79–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Taguchi, T.; Lopez, M.J. An Overview of de Novo Bone Generation in Animal Models. *J. Orthop. Res.* **2021**, *39*, 7–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. McGovern, J.A.; Griffin, M.; Hutmacher, D.W. Animal Models for Bone Tissue Engineering and Modelling Disease. *Dis. Models Mech.* **2018**, *11*, dmm033084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Clark, D.; Nakamura, M.; Miclau, T.; Marcucio, R. Effects of Aging on Fracture Healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2017**, *15*, 601–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Gibon, E.; Lu, L.; Goodman, S.B. Aging, Inflammation, Stem Cells, and Bone Healing. *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, 44. [[CrossRef](#)]
110. Singer, B.R.; McLaughlan, G.J.; Robinson, C.M.; Christie, J. Epidemiology of Fractures in 15,000 Adults: The Influence of Age and Gender. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1998**, *80*, 243–248. [[CrossRef](#)]
111. Haffner-Luntzer, M.; Fischer, V.; Ignatius, A. Differences in Fracture Healing Between Female and Male C57BL/6J Mice. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 712494. [[CrossRef](#)]
112. Hou, J.; He, C.; He, W.; Yang, M.; Luo, X.; Li, C. Obesity and Bone Health: A Complex Link. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 600181. [[CrossRef](#)]
113. Gao, F.; Lv, T.-R.; Zhou, J.-C.; Qin, X.-D. Effects of Obesity on the Healing of Bone Fracture in Mice. *J. Orthop. Surg. Res.* **2018**, *13*, 145. [[CrossRef](#)]
114. Masoud, I.; Shapiro, F.; Kent, R.; Moses, A. A Longitudinal Study of the Growth of the New Zealand White Rabbit: Cumulative and Biweekly Incremental Growth Rates for Body Length, Body Weight, Femoral Length, and Tibial Length. *J. Orthop. Res.* **1986**, *4*, 221–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Kilborn, S.H.; Trudel, G.; Uthoff, H. Review of Growth Plate Closure Compared with Age at Sexual Maturity and Lifespan in Laboratory Animals. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* **2002**, *41*, 21–26. [[PubMed](#)]
116. Li, Y.; Chen, S.-K.; Li, L.; Qin, L.; Wang, X.-L.; Lai, Y.-X. Bone Defect Animal Models for Testing Efficacy of Bone Substitute Biomaterials. *J. Orthop. Translat.* **2015**, *3*, 95–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Schemitsch, E.H. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J. Orthop. Trauma* **2017**, *31* (Suppl. S5), S20–S22. [[CrossRef](#)]
118. Lim, J.; Lee, J.; Yun, H.-S.; Shin, H.-I.; Park, E.K. Comparison of Bone Regeneration Rate in Flat and Long Bone Defects: Calvarial and Tibial Bone. *Tissue Eng. Regen Med.* **2013**, *10*, 336–340. [[CrossRef](#)]
119. Nauth, A.; Schemitsch, E.; Norris, B.; Nollin, Z.; Watson, J.T. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J. Orthop. Trauma* **2018**, *32*, S7. [[CrossRef](#)]
120. Rapp, A.E.; Bindl, R.; Recknagel, S.; Erbacher, A.; Müller, I.; Schrezenmeier, H.; Ehrnthaller, C.; Gebhard, F.; Ignatius, A. Fracture Healing Is Delayed in Immunodeficient NOD/Scid-IL₂Rγnull Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147465. [[CrossRef](#)]
121. Reinke, S.; Geissler, S.; Taylor, W.R.; Schmidt-Bleek, K.; Juelke, K.; Schwachmeyer, V.; Dahne, M.; Hartwig, T.; Akyüz, L.; Meisel, C.; et al. Terminally Differentiated CD8+ T Cells Negatively Affect Bone Regeneration in Humans. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 177ra36. [[CrossRef](#)]
122. Langer, R.; Vacanti, J.P. Tissue Engineering. *Science* **1993**, *260*, 920–926. [[CrossRef](#)]
123. Sallent, I.; Capella-Monsonís, H.; Procter, P.; Bozo, I.Y.; Deev, R.V.; Zubov, D.; Vasyliov, R.; Perale, G.; Pertici, G.; Baker, J.; et al. The Few Who Made It: Commercially and Clinically Successful Innovative Bone Grafts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 952. [[CrossRef](#)]
124. Govoni, M.; Vivarelli, L.; Mazzotta, A.; Stagni, C.; Maso, A.; Dallari, D. Commercial Bone Grafts Claimed as an Alternative to Autografts: Current Trends for Clinical Applications in Orthopaedics. *Materials* **2021**, *14*, 3290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3.1.3 Conclusion

Impliqués dans les stratégies de réparation des tissus osseux depuis les années 1970, le silicium et ses dérivés ont récemment suscité un intérêt croissant dans les domaines de la fabrication additive et de la bio-impression. Dans cette revue, le silicium est apparu comme un élément polyvalent, efficace dans un contexte d'amélioration de la réparation osseuse, que ce soit en tant qu'élément constitutif ou en tant qu'élément additif fonctionnalisant un matériau. Cette revue a mis en évidence la place dominante de l'impression par extrusion, celle du lapin comme modèle animal privilégié, et du fémur comme modèle de création de défaut osseux en ce qui concerne le développement d'encres biocompatibles adaptées à l'impression 3D. Compte tenu de la tendance à l'augmentation du nombre de publications relatives à l'application *in vivo* d'encres dérivées du silicium pour l'ingénierie des tissus osseux, il est attendu que de futurs substituts imprimés, conçus de façon personnalisée pour les patients, intègrent le Si dans le processus de fabrication.

3.2 Les silicium tricalciques et le BioRoot

Comme évoqué dans l'introduction, l'idée d'utiliser une encre matériau avec une propriété intrinsèque de transition de l'état liquide vers une solidification rapide, tel un ciment à prise rapide, a émergé suite aux travaux d'Olivia Kérourédan. La revue de la littérature menée a mis en évidence l'intérêt de recourir à un matériau à base de silicium dans un contexte de réparation osseuse, les silicates calciques sont développés et étudiés *in vivo* [253, 254] depuis un certain temps, et certaines formulations sont disponibles dans le commerce.

Dans le but de développer un matériau avec un fort potentiel de translation clinique, il a été décidé de recourir à un produit bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché. Parmi les candidats disponibles [255, 256], le produit BioRoot RCS® dispose d'une certification européenne CE0459 GMED en tant que dispositif médical, conforme à la Norme ISO 6876 (3e édition, 2012-06) sur les exigences et les méthodes d'essai relatives aux matériaux de scellement (endodontiques) des canaux radiculaires (référence de catalogue ICS :11.060.10 'Produits et matériaux dentaires' dans le domaine 'technologie de la santé'). En outre, le BioRoot RCS® présente la formulation la plus simple, avec le moins d'additifs. Utilisé dans le cadre d'obturation hermétique du canal radiculaire dans le cadre des procédures endodontiques en médecine bucco-dentaires, le BioRoot RCS® est assemblé par mélange d'une poudre composée de silicate tricalcique, d'oxyde de zirconium (radio-opacifiant) et de povidone (agent de dispersion) auquel est incorporé extemporanément une solution aqueuse de chlorure de calcium (accélérateur de la prise du ciment) et polycarboxylate (superplastifiant) [257].

Dans la pratique clinique, l'utilisation du BioRoot RCS® comme ciment canalaire permet d'apporter une meilleure résistance à la fracture des dents présentant un défaut, sans toutefois égaler la résistance d'une dent intacte [258, 259]. *In vitro*, de nombreuses études sur divers modèles cellulaires ont rapporté une bonne cytocompatibilité du BioRoot RCS® [260–267]. Cependant, l'évaluation *in vivo* de silicium tricalcique n'a été que peu explorée, avec une seule étude sur la dissolution d'un ciment à base de silicium tricalcique [268] dans un modèle de défaut fémoral chez le lapin qui met en évidence l'implantation d'une pâte pure de silicium tricalcique, et dont la dissolution au travers du temps s'est traduite par une pauvre ostéoconduction et une décalcification progressive du matériau. Pourtant, les réponses ostéogénique et angiogénique induites par l'apport du BioRoot RCS® ont été rapportées comme propices à la régénération osseuse [266, 269], avec une induction de sécrétion de protéines anti-inflammatoires [270, 271], et une libération d'ions dépendant de l'environnement dans lequel le BioRoot RCS® est placé [272–274] permettant une bioactivité à l'origine de la formation d'hydroxyapatite [275].

L'utilisation du BioRoot RCS®, dans une formulation plus propice à la colonisation cellulaire, est ainsi apparue comme une solution avantageuse pour élaborer une encre-matériau promouvant la régénération osseuse.

3.3 Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'une nouvelle encre à base de silicium tricalcique *via* Bioimpression Assistée par Laser pour la réparation osseuse

3.3.1 Introduction

L'utilisation d'un tel matériau basé sur une composante minérale disposant de propriété intrinsèque de transition gel-sol n'a pas de précédent dans le domaine de l'impression assistée par laser. Pour répondre à l'enjeu majeur d'ingénierie tissulaire que constitue le développement d'encres susceptibles d'engendrer une régénération intégrale du tissu osseux, l'association du BioRoot à un modèle d'encre utilisée de façon standard au laboratoire a été étudiée. Dans un premier temps, la compatibilité du BioRoot vis à vis de la fenêtre d'imprimabilité optimale de la station d'impression laser a été vérifiée. L'incorporation de BioRoot dans l'encre standard utilisée au laboratoire a donc été testée selon 3 différentes concentrations définies par un facteur 2 de concentration ou dilution autour d'une valeur 1:10 rapportée comme non cytotoxique dans la littérature. Les

résultats des test rhéologiques, associés aux résultats des tests d'impressions, ont permis de dégager que la condition 1:10 représentait le meilleur candidat parmi les conditions testées au regard de la fidélité d'impression du motif souhaité. Cette formulation a ensuite été caractérisée *in vitro*, au regard de sa cytotoxicité, de sa capacité d'induire de la minéralisation au travers de l'observation de nodules d'hydroxyapatite et de la quantification d'activité des phosphatases alcalines, et de l'impact de cette encre sur la mobilité et motilité cellulaire. Enfin, les essais *in vivo* ont été menés dans un modèle de défaut osseux circulaire bilatéral de taille critique ($\varnothing 3.3\text{mm}$) chez la souris.

3.3.2 Original article : "*In vitro* and *in vivo* characterization of a novel tricalcium silicate-based ink for bone regeneration using laser-assisted bioprinting"

Biofabrication



PAPER

In vitro and *in vivo* characterization of a novel tricalcium silicate-based ink for bone regeneration using laser-assisted bioprinting

RECEIVED
15 September 2021

REVISED
16 December 2021

ACCEPTED FOR PUBLICATION
24 February 2022

PUBLISHED
9 March 2022

Nicolas Touya^{1,*} , Mathilde Devun¹, Charles Handschin^{1,4}, Sophia Casenave^{1,2,3}, Naïma Ahmed Omar¹ , Alexandra Gaubert⁵, Nathalie Dusserre^{1,4} , Hugo De Oliveira^{1,4} , Olivia Kérourédan^{1,2,3}  and Raphaël Devillard^{1,2,3} 

¹ INSERM, U1026 BIOTIS, University of Bordeaux, Bordeaux, France

² Faculty of Dentistry, University of Bordeaux, Bordeaux, France

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

⁴ ART BioPrint, INSERM U1026, Bordeaux, France

⁵ INSERM U1212, UMR CNRS 5320, F-33076, University of Bordeaux, Bordeaux, France

* Author to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: nicolas.touya@u-bordeaux.fr

Keywords: tricalcium silicate, ink, bioink, laser-assisted bioprinting, bone repair, tissue engineering, *in vivo*

Supplementary material for this article is available [online](#)

Abstract

Grafts aside, current strategies employed to overcome bone loss still fail to reproduce native tissue physiology. Among the emerging bioprinting strategies, laser-assisted bioprinting (LAB) offers very high resolution, allowing designing micrometric patterns in a contactless manner, providing a reproducible tool to test ink formulation. To this date, no LAB associated ink succeeded to provide a reproducible *ad integrum* bone regeneration on a murine calvaria critical size defect model. Using the Conformité Européenne (CE) approved BioRoot RCS® as a mineral addition to a collagen-enriched ink compatible with LAB, the present study describes the process of the development of a solidifying tricalcium silicate-based ink as a new bone repair promoting substrates in a LAB model. This ink formulation was mechanically characterized by rheology to adjust it for LAB. Printed aside stromal cells from apical papilla (SCAPs), this ink demonstrated a great cytocompatibility, with significant *in vitro* positive impact upon cell motility, and an early osteogenic differentiation response in the absence of another stimulus. Results indicated that the *in vivo* application of this new ink formulation to regenerate critical size bone defect tends to promote the formation of bone volume fraction without affecting the vascularization of the neo-formed tissue. The use of LAB techniques with this ink failed to demonstrate a complete bone repair, whether SCAPs were printed or not of at its direct proximity. The relevance of the properties of this specific ink formulation would therefore rely on the quantity applied *in situ* as a defect filler rather than its cell modulation properties observed *in vitro*. For the first time, a tricalcium silicate-based printed ink, based on rheological analysis, was characterized *in vitro* and *in vivo*, giving valuable information to reach complete bone regeneration through formulation updates. This LAB-based process could be generalized to normalize the characterization of candidate ink for bone regeneration.

1. Introduction

To date, bone critical defect repair remains a challenging issue of tissue engineering. Many strategies rely on the use of competent cells in order to sustain bone regeneration [1, 2]. Mesenchymal stromal

cells (MSCs) were extensively studied in bone critical defect model for their stemness abilities to (a) self-renew and (b) differentiate towards osteogenic lineages [3, 4]. However, their sole use failed to provide an *ad integrum* regeneration of the damaged tissue after a physiological healing time for non-critical

defects [5–7]. Among ‘MSC-like’ cells, stromal cells from apical papilla (SCAPs) [8] demonstrated their regenerative potential [9, 10]. Derived from the apex of maturing teeth, they represent a valuable asset [11] for tissue engineering, with potential clinical outcomes in dentistry and maxillo-facial applications.

Previously published study [12] demonstrated that a co-culture model involving human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and SCAPs allowed to obtain a greater bone repair and a higher vascularization of critical calvaria defect in mice using laser-assisted bioprinting (LAB) [13]. This bioprinting technique, derived from laser induced forward transfer, permitted to spatially organize the printed elements directly *in situ*, with an unprecedented resolution. It highlighted that differences in the host vascularization response were exclusively induced depending on the printed pattern design. In spite of this progress, no reproducible *ad integrum* regeneration was observed. It was hypothesized that, at the site of the defect, the local absence of a solid substrate to support osteogenesis may be responsible for the lack of bone regeneration. To pursue these efforts and study the role of patterning upon the host local response, the development of a new ink, compatible with LAB process impediments and solidifying *in situ* post-printing, was conducted. Among candidates, tricalcium silicate-based biomaterials stood out with their fluid-solid transition [14] within adequate setting time.

The use of tricalcium silicate-based cements has raised many interests in endodontics and subsequently in bone tissue engineering, especially regarding the biomaterial composition and its related *in vitro* properties upon environmental damaged tissue surrounding cells [15, 16], and bone-regenerating competent cells. First, tricalcium silicate hydration reaction can be modulated to generate apatite nucleation close to physiological hydroxyapatite, placing tricalcium silicate as a central candidate for bone repair oriented biomaterials [17, 18]. BioRoot RCS® was chosen among other candidates CE/FDA (Food and Drug Administration) approved for its physical behavior (being extemporaneously fluid, then solidifying) and its minimalist formulation (tricalcium silicate, zirconium oxide, calcium chloride and povidone) [19]. Previously described with other models and based on literature evidence, this mineralized ink (MI) was supposed to promote cell osteogenic differentiation and polarization/migration. Tricalcium silicate, depending on the cell model, was described to enhance differentiation and promote *in vitro* mineralization [20–23]. The calcium released [24] (calcium chloride) through time (1700 ppm in a Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)) also has a theoretical impact upon cell polarization, migration and differentiation potentials [25, 26]. Zirconium oxide (ZrO_2), the radio-opacifier element, is

used for clinical follow-up of the BioRoot RCS®. ZrO_2 was found to be not only non-cytotoxic at least for MSCs [27], but also to upregulate osteogenic-related genes [28]. Altogether, the BioRoot RCS® seemed to be a great candidate to promote bone repair, offering both a solid substrate as osteoconductive support by its physical properties, and an osteoinducer material based on its mineral composition enhancing osteogenic cell lines potentials. However, the question of *in vivo* persistency (and effect) of such adapted biomaterial remains elusive in bone defect models, in spite of *in vitro* evidence [24, 29].

Using LAB technology, the present study aimed to develop an MI and determine its *in vitro* incidence over cell proliferation, differentiation and *in vivo* impact on vascularization and bone repair through a standardized analysis based on rheological analysis. Efforts were made to provide an extensive comprehension of host response regarding spatial organization of printed bioinks.

2. Methods

2.1. MI physico-chemical characterization

2.1.1. Rheological characterization

All experiments were performed using a Kinexus® Pro+ rheometer (Malvern Instruments Ltd, United Kingdom). A Peltier system enabled to control the temperature at the lower plate level (25 °C for the experiments except in the case of GelSol determination). The upper plate was a steel cone-plane with 1° angle (diameter: 20 mm, gap: 0.029 mm) combined with a solvent trap to prevent solvent evaporation. All samples were placed extemporaneously at the liquid state between the geometries. For the viscosity exploration, a pre-shear step was performed at 10 s⁻¹ for 1 min prior to an equilibration step of 2 min. Then the samples were submitted to a continuous ramp of shear rate from 0.01 to 500 s⁻¹. For all samples, the linear viscoelastic region (LVR) was determined by amplitude sweep experiments (shear strain 0.01%–100%; frequency at 1 Hz). All further experimentations were performed within the LVR. The frequency sweep enabled the determination of elastic (G') and viscous (G'') moduli (shear strain at 0.3% or 0.08% for Standard Ink (SI) and MI respectively; frequency from 0.1 to 10 Hz). GelSol temperature was determined using a temperature ramp of 2 °C between 25 °C and 80 °C with all other parameters set at 0.3% (SI) or 0.08% (MI) for the shear strain, and 1 Hz for the frequency. Structuration/destructuration cycles were applied to highlight the shear-thinning behavior of the formulations. The only variant parameter was the shear strain: within the LVR for the structuration steps (0.3% or 0.08% for SI and MI respectively) and at 150% (over the breaking point) for the destructuration steps. Frequency remained unchanged at 1 Hz. At least three replicates were done for each sample.

2.1.2. *SEM and energy dispersive x-ray (EDS) analysis*
SEM analysis and EDS analysis were performed with a Tescan VEGA3 device (TESCAN Analytics, France) (Hv: 20 kV). 1:10 MI samples were printed beforehand on glass slides and dried in atmospheric air.

2.2. Cell culture

2.2.1. SCAPs and GFP-labeled SCAPs

The SCAPs used for the hereby experiments were taken from a batch of cells already characterized [30]. The cells correspond to the UBx-SCAPs-N1, N3 and N4 cells classically derived under 21% O₂. Briefly, cells were derived from germs of third molars, obtained from young patients at the *Service de Médecine bucco dentaire du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux*. All experimental protocols were led following guidelines and regulations, under Ministerial approbation regarding French law ('DC-2008-412'; *convention INSERM-CHU de Bordeaux*). All patients gave their consent to have their samples used for research purposes. If patients were under majority status, an additional consent from a parent and/or legal guardian was requested. Samples were treated anonymously. Freshly extracted teeth were placed in Minimum Essential Medium Alpha (α -MEM, Gibco, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and penicillin (100 U ml⁻¹)/streptomycin (100 μ g ml⁻¹) (Life Technologies, SAS). Cells were extracted according to previously described method [8]. Dental apical papillae were digested in a mixture of 3 mg ml⁻¹ collagenase (Sigma-Aldrich) and 4 mg ml⁻¹ dispase (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C. The obtained cell suspension was sifted through a 40 μ m hole-size nylon sieve (BD Biosciences) and then seeded in a 75 cm² culture flask (37 °C, 5% CO₂). Non-adherent cells were removed after two days, and the medium was changed three times a week until cells reached 95% confluence. Cells were characterized by flow-cytometry for the expression of MSC markers (CD90, CD73, CD45), as previously published. Part of the cells were transduced with a vector containing the Green Fluorescent Protein gene sequence under the control of the EF1 α promoter following a procedure similar to the one previously described [31], generating UBx-SCAPs-N3GFP and UBx-SCAPs-N4GFP. All SCAPs were amplified or cultured in tissue culture flasks in α -MEM supplemented with 10% FBS, in a controlled atmosphere (5% CO₂, 95% relative humidity, 37 °C). All cells were cultured and used for experimentations with a maximum passage number under 7.

2.2.2. HUVECs

HUVECs were isolated from human umbilical cord of healthy newborns, as previously described [32]. All mothers provided written informed consent to have their samples used for research, and the protocol

followed the rules of the declaration of Helsinki. The obtention of the samples used in this study was also under the French Ministerial approval and authorizations (Ministerial approval 'DC-2008-412'; convention INSERM-CHU de Bordeaux). Samples were treated anonymously. HUVECs were transduced with a vector containing the mKate (red fluorescing) protein gene sequence under the control of the EF1 α promoter following a procedure similar to the one previously described. mKate-labeled HUVECs were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing 20% FBS (GE Healthcare, Pasching, Austria), 20 μ g ml⁻¹ endothelial cell growth supplement, 90 μ g ml⁻¹ heparin (ECGS/H 0.4% (v/v); PromoCell, Heidelberg, Germany) in a controlled atmosphere (5% CO₂, 95% RH, 37 °C—incubator (Binder, Germany)). All cells were cultured and used for experimentations with a maximum passage number under 9.

2.3. Inks preparation

2.3.1. MI

BioRoot RCS® (Septodont, France) preparation was diluted at 1:5 (1 g ml⁻¹), 1:10 (0.5 g ml⁻¹) or 1:20 (0.25 g ml⁻¹) (v/v) in a mix of 2 mg ml⁻¹ type 1 collagen from rat tail (Corning, Bedford, MA, USA) in DMEM (Gibco, Paisley, Scotland, UK). The inks were prepared extemporaneously, kept at +4 °C and homogenized before use. For pipette deposit, a 200 μ m thick layer was manually delivered (1.7 μ l) in the defect. Please note that *in vitro* and *in vivo* use of MI exclusively relied on the 1:10 preparation.

2.3.2. Cell-based ink

Cells were detached from the polystyrene tissue culture surface with a solution of trypsin-EDTA (0.05% 1X Gibco, UK). Cells were suspended in their respective culture media. The cell suspension was concentrated at 70 million cells·ml⁻¹, according to previously described protocol [33]. Then, a 30 μ m thick film of cell bioink (33 μ l) was manually spread on the gold-coated ribbon surface 'donor slide'.

2.4. LAB process and settings

The LAB workstation used in this study was previously described [34]. The workstation laser source was a solid Nd:YAG crystal laser (Navigator I, Newport Spectra Physics, 1064 nm, pulse duration of 30 ns, 1–100 kHz repetition rate, 7 W mean power). The scanning system comprised two galvanometric mirrors (SCANgine 14, ScanLab), with a maximal scanning speed of 2000 mm s⁻¹. The laser beam was focused on the donor slide (quartz ribbon) covered by a 30 μ m layer of ink (as aforementioned). The ribbon consisted of a 30 mm diameter round quartz slide (Société VM, Epinal, France) that was coated using

a sputter coater (EMSCOPE SC500, Elexience) with a thin absorbing layer of gold (60 nm). A dedicated software was used to design the pattern and position the substrate, also allowing to center bioprinting area with *in situ* video imaging (CCD camera). All experiments were performed in air, at room temperature, with a distance of 1 mm between the ribbon and the substrate. The transfer process was performed using laser pulse repetition rate of 1 kHz and an energy of 28 μJ for cell based inks, and an assay range of 30–40 μJ for MIs (final energy chosen: 35 μJ).

The laser focused on the gold layer triggered the transfer of droplets from the ink to the substrate according to the selected pattern. In the present study, a pattern geometry was used for the MI exclusive study (a $\varnothing 3$ mm disc), and two pattern geometries involving cells were used: a ring (external diameter: 2.9 mm; internal diameter: 2.1 mm) and a disc ($\varnothing 2$ mm). Each pattern was designed in order to obtain a final cell density of about 2×10^3 cells mm^{-2} , according to previous results [12]. All conditions involved the same quantity of ink, *id est* the same final number of cells per defect.

2.5. SCAPs-MI interaction

For this interaction assay, cells were seeded directly over a smear spread layer of MI on a glass slide and put seven days in standard culture medium. F-actin and nucleus structures were respectively stained by Alexa 546-Phalloidin and DAPI. Images were captured on confocal Leica TCS SPE microscope and assembled on ImageJ software.

2.6. Metabolic assay

An identical number of non-labeled cells (3×10^5 c cm^{-2} for the HUVECs assay, 1×10^4 c cm^{-2} for the SCAPs) were cultured in absence or presence of MI. MI was delivered according to two quantities: a 'LAB dose' (50 nl i.e. the amount of ink delivered by the LAB workstation designed for *in vivo* experiments, calculated per approximation based on the droplet size [13] obtained with our printing parameters), or a 'High dose' (1.7 μl , i.e. the amount of ink equivalent to the volume of bone removal during the creation of the calvarial critical-size defect, filled with a pipette for *in vivo* experiments). Media were renewed every two days, and observations were realized at days 1 (and also 3, 5 for HUVECs experiment), 7, 14, 21 and 28. Briefly, AlamarBlue™ (0.1 mg ml^{-1} , Sigma-Aldrich, France) was diluted at 1:15 (v/v) in standard culture medium and placed with cells for 2 h at 37 °C. Supernatants were retrieved and transferred to a microplate while wells containing cells were rinsed, then refilled with standard culture medium and placed back to the incubator. Plate reading was performed with Victor™X3 (Perkin Elmer) spectrophotometer (λ_{ex} 530 nm and λ_{em} 590 nm).

2.7. Alkaline phosphatase (ALP) assay

ALP activity was quantitatively determined by assessing cell lysates of SCAPs cultured on plastic in presence or absence of MI. Lysates were obtained by applying 1% Triton X-100 NaOH buffered (pH 8.8) on cells before freezing it. After thawing, successive flushes achieved to obtain cell lysate. Then, lysates were incubated with p-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma-Aldrich Alkaline Phosphatase, Diethanolamine Detection) and Optical Density (OD) were measured with Victor™ X3 (Perkin, Elmer) spectrophotometer (λ_{ex} 405 nm) at successive time points to determine ALP activity. This activity was then normalized to the total protein concentration determined in lysates using BCA Protein Assay Kit (Pierce™), also measured by spectrophotometry (λ_{ex} 560 nm) and therefore expressed in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of total protein.

2.8. Differentiation assay

An identical number of non-labeled SCAPs (1×10^4 cells. cm^{-2}) was cultured in presence or absence of MI and with standard culture medium (Alpha-MEM) or differentiation medium (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco™). Media were renewed every two days, and observations were realized at days 14, 21 and 28.

The reveal of the synthesis of nanohydroxyapatite nodules was performed with Osteoimage™ kit (Lonza Bioscience) according to manufacturer instructions. Plate reading was performed with Victor™ X3 (Perkin, Elmer) spectrophotometer (λ_{ex} 492 nm and λ_{em} 520 nm).

2.9. Migration tests and timelapse analysis

LS720 Microscope associated with Lumaview software (Etaluma Inc., US) were used to perform timelapse acquisition of bioprinted patterns of the different inks. The acquisitions were conducted for 120 h (one photo every 15 min), without culture medium renewal. To prevent a focus loss due to a possible hydrogel (collagen-based substrate) contraction because of cell adhesion, a large Z (height) focus range associated to a long time of focus was set (400 μm upper and below the focus height, with 30 s of focusing time). Only fluorescing elements larger than 10 pixels² areas were identified as cells. Initial cell count was not performed during the first 24 h as the cells were printed with a too high density as aggregates to proceed to a relevant count by observation. Two types of tests were performed: first, MI was printed at various distances (300, 600, 1200 and 1600 μm) from three cell spots (100 μm wide each, put aside in a line) to discriminate an impact of the distance over cell migratory capacity. The cells spots were printed at an equivalent distance from each other group (2000 μm) to limit cell interaction bias. The second assay was the printing of identical pattern to those designed for

in vivo experiments, to evaluate the ability of the MI to contain or attract printed cells.

Icy [35] and ImageJ [36] software were used to perform the analysis of the regions of interest (ROIs) for migration assays.

2.10. Animal experiment

All experiments and procedures involving living animals were carried out under the approbation of the Animal Care and Experiment Committee of University of Bordeaux (France) and the French *Ministère de L'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation* (number APAFIS# 26 515-2020070611516930-V3 and APAFIS#8442-201701051243776-V2), accordingly to the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. Eight-week-old NSG female mice (NOD/LtSz-*scid*IL2R γ ^{null}) were employed.

The surgical procedure used in this study was previously described [12]. Briefly, mice upper heads were shaved while they were under a soft inflow of 2% isoflurane gaz. Afterwards, surgery-related pain was prevented by intraperitoneal injection of buprenorphine (0.08 mg kg⁻¹, Axience, France), and animals were anesthetized with a solution of ketamine (90 mg kg⁻¹, Imalgen, Merial, France) and xylazine (9 mg kg⁻¹, Rompun, Bayer, France) by intraperitoneal injection. After performing skin antisepsis (Betadine), an incision was made in skull midline and the scalp was pushed aside to expose the calvaria. Two lateral Ø3.3 mm circular bone defects were created using an external Ø3.3 mm trephine (Praxis l'instrumentiste, France). One defect was left as a control for critical bone defect proof ('negative control'), and the other was dedicated to the laser bioprinting procedure. The surgical site was rinsed with a NaCl solution (Proamp 0.9%, Laboratoire Aguettant, Lyon, France). In all conditions, a collagen solution was applied in order to cover the dura mater. Then, the mouse was placed onto a stereotaxic rack (specific mouse holder) inside the LAB workstation for *in situ* printing experiment. The experimental defect was visualized via a CCD camera, to focus the laser beam at the center of the defect. For each mouse, only the right defect underwent LAB procedure. The quality of the printed pattern was assessed immediately post-printing using fluorescence microscopy (Leica MZ10 F, Leica Micro systems Ltd, Heerbrugg, Switzerland). At the end of the experiment, tissues were repositioned and sutured using 3/0 vicryl (Johnson and Johnson, USA). A warm (37 °C) environment was maintained throughout the procedure. Animals were then brought back to animal housing facility and a special follow-up of their recovery was performed daily for five days after the surgery. At defined time points (one month or two months), the mice were sacrificed by cervical dislocation, practiced by qualified staff. Calvaria tissues were retrieved and processed for x-ray microtomography and histological analysis.

2.11. X-ray microtomography

Micro-CT was performed on Explore Locus SP x-ray μ CT device (General Electric, Milwaukee, WI) *ex vivo* with a source voltage of 90 kVp and a current of 160 mA. After scanning, cross-sectional slices were reconstructed and three-dimensional (3D) analyses were performed using eXplore MicroView® software (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI). Reconstruction of the ROI was performed after calibration of mineral density (MD). A Ø3.3 mm per 1.5 mm long cylindrical volume of interest (VOI) was generated in order to cover the volume of the original cylindrical defect made by the trephine drill. Each scan was reconstructed using the same calibration system to distinguish bone and air through defined thresholds. BioRoot RCS®, which possesses a specific radio-opacity, was also discriminated from bone by thresholding. Mineral Content and MD volume were measured for each group. The bone volume fraction (BVF) within each cylindrical VOI was calculated using eXplore MicroView® software (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI), as follows:

$$BVF = \text{Bone volume} / \text{Total volume.}$$

To compare the effect of the different studied conditions on bone regeneration, BVF were evaluated for each experimental condition. The BVF value in the control defect (defect filled with collagen) was defined as 100% and compared to the value of BV/TV in experimental defects.

2.12. Histological analysis

The animal skulls were harvested, fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 24 h at 4 °C and then demineralized during 1 h (Microdecalcifiant EDTA-Based, Microdec®, Diapath, France), dehydrated and embedded in paraffin. Six micrometers wide coronal sections were cut and stained with hematoxylin-erythrosin-saffron using standard protocols, and observed under a photon microscope (Nikon Eclipse Ni-U, Netherlands). Sections were assessed for staining uniformity and vessels counts were performed ($n = 3$ sections per animal). Vessels were identified by their luminal structure and the presence of red blood cells. To measure vessel density, counts were then expressed as the number of vessels mm⁻² of neoformed tissue. ImageJ [36] software was used to perform the analysis of the ROI at the defect periphery.

2.13. Statistical analysis

All tests were performed using GraphPad Prism version 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA). Non-parametric tests were selected when Gaussian distribution of values could not be found by normality test, or when the sample size was not satisfying test requirements. H0 hypothesis was rejected when p -value < 0.05.

3. Results

3.1. Physico-chemical evaluation of MI

3.1.1. Rheological characterization of MI

An hydrogel composed of collagen and DMEM was chosen as a standard ink (SI), as collagen is the most abundant protein of non-mineralized fraction in bone tissue. BioRoot RCS® was added at a concentration of 0.25, 0.5 or 1 g ml⁻¹ respectively corresponding to 1:20, 1:10 and 1:5 proportion to obtain the MIs. In order to evaluate the impact of this addition at a mechanical level for the impression by LAB, rheological experiments were done (figures 1 and S1 available online at stacks.iop.org/BF/14/024104/mmedia). In both case, SI and MIs exhibited a pseudo-plastic behavior characterized by a decrease of viscosity with the shear rate.

With elastic moduli higher than the viscous ones ($G' > G''$), MIs presented a solid like state leading to a hydrogel more than 50-fold stiffer than SI. MIs were also less dependent to frequency but more fragile with a shorter LVR. The tricalcium silicate-based compound increased the material stiffness but also led to macroscopic and microscopic modifications at lowest constraints. Even if a modification of the 3D structure could be highlighted rheologically, the transition from the solid-like state to the liquid state required higher constraints than SI.

Concerning the GelSol temperature, the transition from the gel state to the sol one was observed at 56 °C in the case of SI but no real transition for MIs potentially due to the addition of Bioroot RCS®.

One particular point of interest for bioprinting is the shear thinning capacity of the hydrogel-based inks: the ability of a material to go from a gel state to a liquid state under high constraints (beyond the breaking point) and then goes back to its initial state without the applied stress. Contrary to SI, 1:10 and 1:20 MIs were not able to recover after the breaking phase with a loss of moduli of more than 95%. Only the 1:5 preparation showed, after a long recovery time compared to control (37.5 min vs immediately), moduli back to their initial values, and even ~five-fold higher at the end of the experiment (66 min). After a few assays of printability over different substrates (data not shown), 1:10 preparation (0.5 g ml⁻¹) candidate was chosen for its consistency in pattern fidelity outcome.

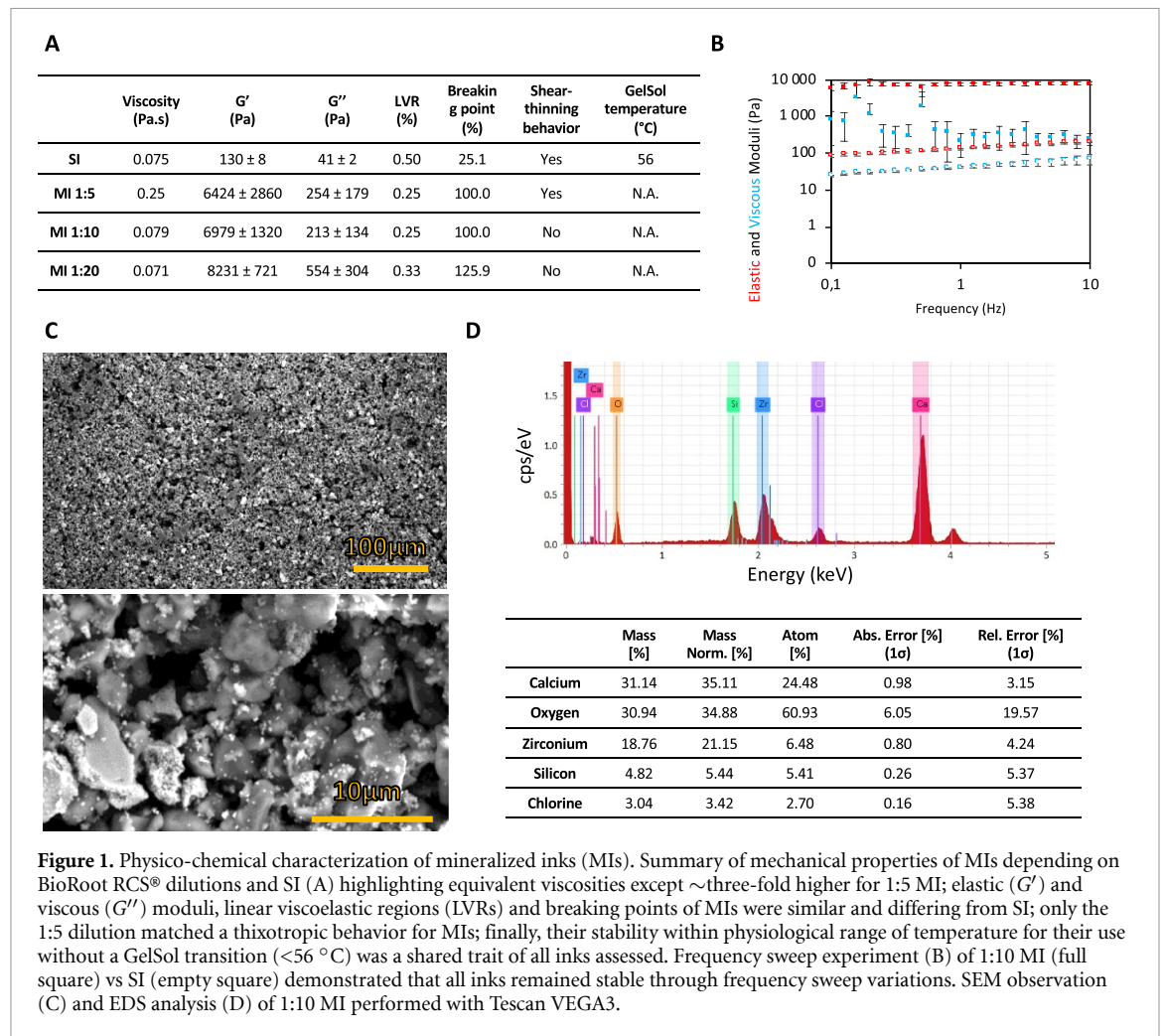
3.1.2. SEM and EDS analysis

SEM acquisitions revealed the granular component of MI, constituted by large (roughly 5–15 μm) and smaller (<1 μm) particles homogeneously dispersed within the ink. The EDS analysis provided information regarding the atomic composition of MI. Peaks were observed on elements claimed to be constituents of the BioRoot RCS: calcium, oxygen, zirconium, silicon and chlorine. The quantification of the different elements was consistent with literature findings [37].

3.2. *In vitro* evaluation of MI upon cell viability, migration capacities and osteogenic phenotyping

To qualitatively evaluate SCAPs interaction with MI, confocal imaging was performed. It appeared (figure 1(A)) that, on site of MI deposit, cells formed entanglements surrounding aggregates of MI, which suggested that MI had no cytotoxic impact upon SCAPs. To confirm this observation, a metabolic AlamarBlue™ assay (figure 2(A)) based on resorufin fluorescence was performed on patterns matching with *in vivo* designed experiments. In a response similar to control condition, SCAPs in culture with MI (figure 2(C)) increased their metabolic activity over time. Cell confluency was reached roughly at day 14, which means proliferation was considerably reduced in spite of the SCAPs ability [38] to grow as multilayer structures in some areas, a phenomenon observed independently of the MI dose delivered. However, the cells maintained their aerobic respiration and the SCAPs in presence of MI exhibited similar levels of resazurin reduction as control. Altogether, these results suggested that the formulation of MI was cytocompatible for SCAPs. To explore a potential enzymatic activity modification due to MI presence, ALP activity assay was performed on days 7, 14 and 21. Results revealed, for cells in standard medium, no significant difference regarding the presence or the absence of MI for ALP activity. Cells that underwent differentiation with dedicated (osteogenic differentiation) medium however expressed a significantly higher activity compared to the other conditions at day 14, and a significant difference to cells with MI in standard medium on day 7.

The MI formulation impact on SCAPs ability to commit towards osteogenic lineages and develop a mineralizing phenotype to promote bone repair was investigated. A differentiation test (figures 2(B) and S2(C)) was performed, using differentiation inducing medium as a positive control for the secretion of mineral nodules by cells. For each time point, all data were normalized according to the control condition (cells in presence of standard growth medium, i.e. alpha-MEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics (P/S)). In a differentiation-inducing medium (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco®), the MI did not significantly affect the synthesis of hydroxyapatite nodules. Through time, the differentiation medium was consistent to induce a significant difference in the mineralization ability of the cells cultured in the standard medium. Interestingly, in a standard medium deprived of differentiation factors, the presence of the ink was sufficient to trigger a significant formation (+33.7% vs control) of nanohydroxyapatite nodules in the early commitment of SCAPs (day 14 and day 21). This difference is yet to be moderated by the fact that the presence of the differentiation medium induced a much higher synthesis of hydroxyapatite (+542% average vs control). With time, the significance of this MI-mediated



early observation was reduced but remained close to statistical significance (Std Med VS Std Med + MI at $D28_{p\text{-value}} = 0.0597$). However, in comparison to the differentiation medium, the use of the MI was not able to trigger as much hydroxyapatite secretion as the differentiation medium did (15-fold difference vs control at day 28). In summary, the use of MI enhanced the early synthesis of nanohydroxyapatite nodules, but was unable to meet the level of differentiation obtained with a dedicated medium.

The MI impact upon cell migration was assessed through two experiments (figure 3). First, the spatial range effect of MI was determined by printing MI spots at different distances from SCAPs (figure 3(A)): no significant effect of printing distance up to $1600 \mu\text{m}$ was observed on cell speed. However, the sole presence of MI induced an overall higher cell motility (+19.4%). To determine a potential chemo-attractive effect of MI, cells were printed as the *in vivo* designed patterns: a disc of SCAPs with a surrounding ring of MI, or a disc of MI with a surrounding ring of SCAPs. Negative controls were designed as the same patterns, without printing MI. Timelapse acquisition through five days allowed to track and stack all cellular trajectories (figure 3(B)). Different ROIs were

drawn, calibrated around the central disc of the pattern ($Z1 = 500 \mu\text{m}$ radius disc), then drawn as eccentric rings ($500 \mu\text{m}$ wide band rings). Fluorescent signal emitted by cells through time was collected and compared to patterns printed without MI. Surrounding SCAPs by MI did not affect their spreading outside of the pattern (figure 3 (B-2)), neither placing them as a ring around a disc of MI (figure S3).

3.3. *In vivo* evaluation of MI regarding vascularization and tissue mineralization

In vivo evaluation of MI was assessed by pipette deposit or using LAB (figure 4(A)) to print designed patterns (figure 4(B)) at the defect site. The host response regarding the use of a large amount of MI *in vivo* to assess a potential consequence on neo-vascularization at the defect periphery remained elusive. Despite a slight tendency, the vessel density (figures 4(C), S4(B) and (C)) determined at one month was not found to be significantly different ($p = 0.6623$) between the defects filled with the high amount of MI and the control. Two months post-bioprinting, no difference in vessel density was found at the defect site between the control and the pipette deposit.

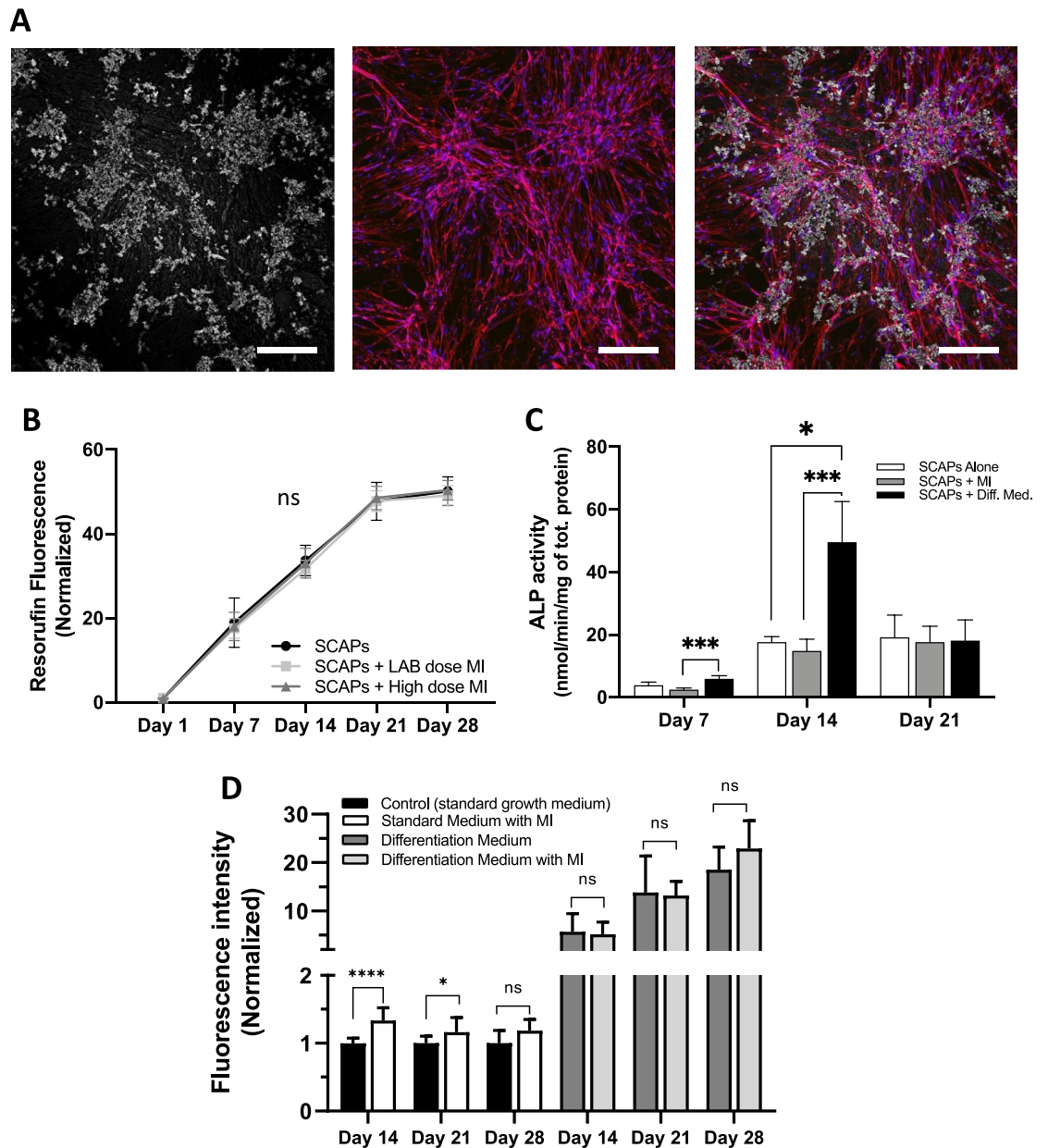
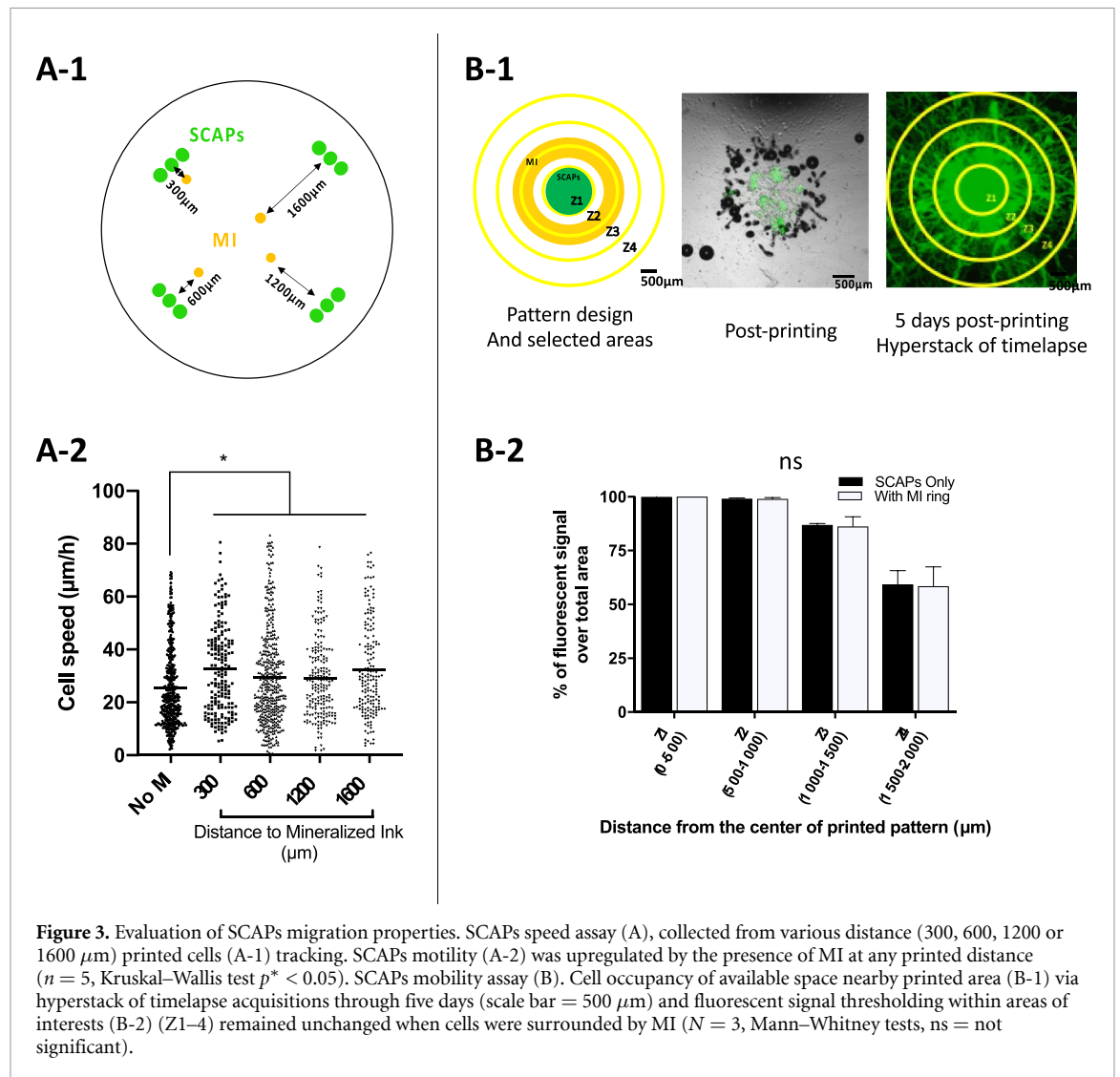


Figure 2. *In vitro* characterization of mineralized ink (MI) over stromal cells from apical papilla. SCAPs-MI interaction (A) with MI (left panel, shades of grey), SCAPs (center panel, phalloidin (red) and DAPI (blue) stainings respectively marking cytoskeleton and nucleus of SCAPs) and the overstack of both (right panel) scale bars = 200 μm . Metabolic AlamarBlue assays reveal MI cytocompatibility with SCAPs (B) ($N = 3$, Kruskal–Wallis test, ns = not significant). Alkaline phosphatase activity (C) of SCAPs over total protein content with or without MI in standard medium or with a differentiation medium through time ($N = 2$, $n = 8$). Osteoimage fluorescence assays (D) highlighted SCAPs hydroxyapatite nodules synthesis in standard culture medium or osteogenic differentiation-inducing medium, with or without MI ($N = 3$, Mann–Whitney tests, ns = not significant; $p^* < 0.05$; $p^{****} < 0.0001$).

Two months post-surgery, the amount of MI was found to have a significant impact on bone volume formation (figures 4(D) and S4(A)). Three questions were addressed: first, the use of MI as an enhancer of bone tissue formation at the site of the defect was evaluated. A Kruskal–Wallis test was performed (p -value = 0.0466), but no multi-comparative post-test presented any significant difference over all the conditions. Second, the direct impact of the dose delivered *in situ* was assessed. The Mann–Whitney test between the pipette and the LAB MI deposit highlighted, in a significant (p -value = 0.0138) manner,

that using a large dose of MI delivered *in situ* led to a higher formation of mineralized tissue.

Finally, as the use of a LAB-compatible dose of MI was not found to be effective to improve bone repair, the impact of co-printing SCAPs with the MI was studied (figure 4(D)). With the same amount of MI and SCAPs, two opposed patterns were assessed: a disc of MI with a surrounding ring of SCAPs, and a disc of SCAPs with a surrounding ring of MI, both centered with the defect. No difference in bone repair was found between the two patterns, despite a statistical value close to significant threshold

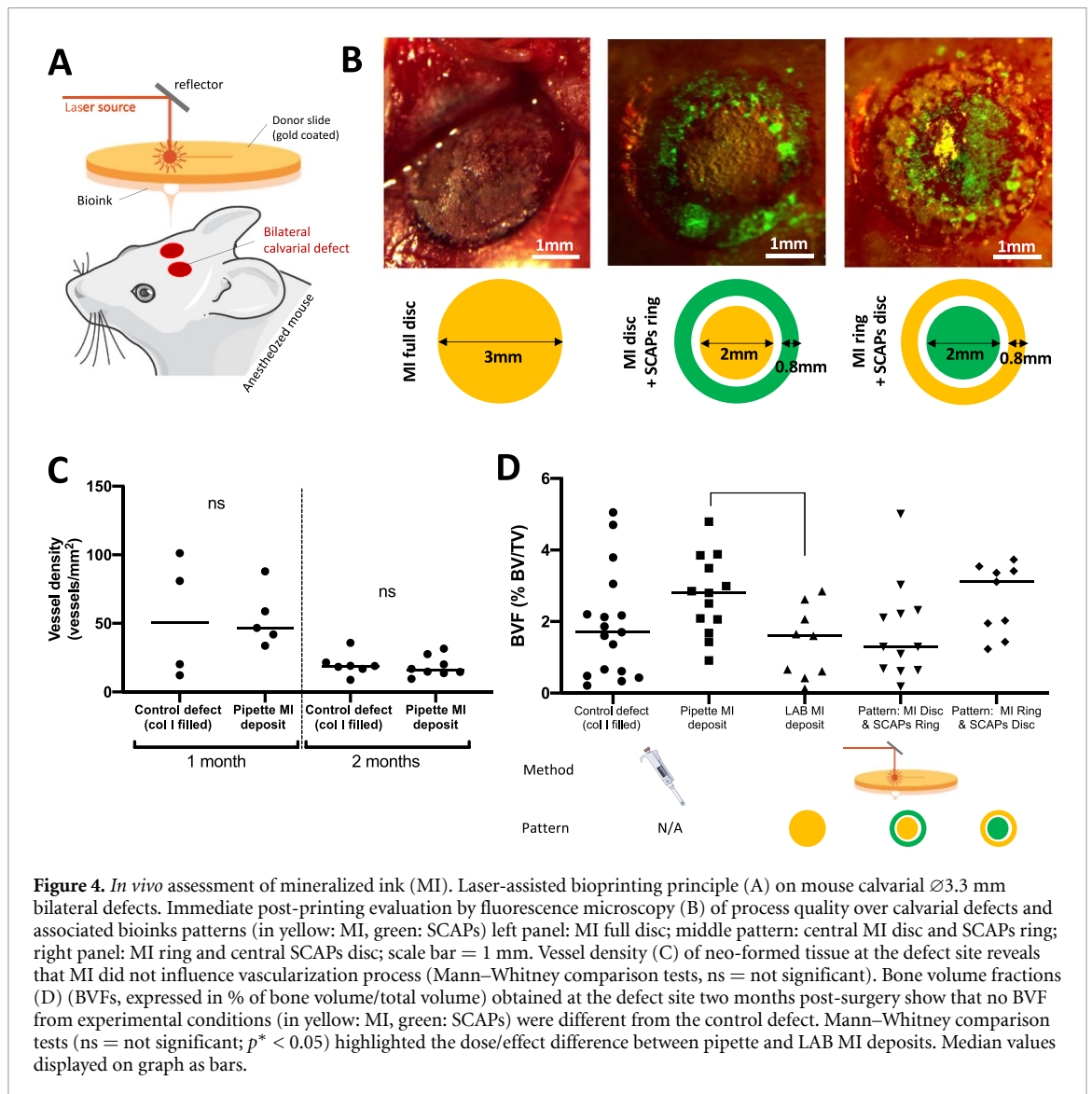


(p -value = 0.0585) in favor of the use of the MI ring with SCAPs printed as a disc at the center of defect site.

4. Discussion

Bioprinting strategies rely on reproducible and repeatable processes [39] with predictable outcomes. The development of an ink, on a physico-chemical level, is essentially subject to fulfill rheological specificities depending on the process used [40]. The best candidates are the ink formulations that can fit with different printing stations and/or different printing techniques. The ink outcome also must be considered while assessing printability [41]. Thus, a balance between optimal printing parameters for one specific process and ink use versatility must be found [42]. Characterizing rheological properties is therefore a crucial step to ensure that a novel ink complies with the bioprinting process requirements [43]. Employed here, LAB is a laser induced forward transfer derived technology, with its own specificities regarding rheological needs for printability. With a

trial/error strategy, we determined that the 1:10 dilution of BioRoot RCS® resulted in high printability regarding ink spreading, with a great pattern fidelity from donor to receipt ribbons. Based on rheological measurements, MI presented the same viscosity as SB. Therefore, the printability was supposed to be the same. However, to perform satisfying printing and reach pattern fidelity, it was necessary to adjust the energy delivered by the laser, from 28 μJ for SI to 35 μJ. This difference may be explained by the macroscopic aspect of MI which, due to tricalcium silicate aggregates, created heterogeneity and granular aspect. The colloidal nature of MI was highlighted by SEM observation and consistent with literature findings. The hereby formulation was however not different, regarding the atomic composition of ink dried samples, from literature evidence. Thus, this heterogeneity, in spite of the presence of polycarboxylate as dispersing agent, probably led to a perturbation in weak interactions within the ink, resulting in a shorter LVR. Also, MI was found to be drastically stiffer than SB, with levels approaching mesenchymal cells requirements to promote osteogenic differentiation



[44, 45]. MI required a much higher constraint to get destructured, but its behavior after reaching breaking point was not thixotropic due to its granular nature. To be used for bioprinting purposes, MI needed to be printed at the liquid state to ensure an instantaneous gelation on the site of interest without losses of stiffness. Regarding GelSol transition, all biomaterials were thus usable in temperature range related to *in vitro* and *in vivo* applications. The heat associated with the use of a laser is irrelevant in this case, since the duration of the processes implying laser impulse were less than a second, generating negligible heat given the nanosecond source and the low frequency rate [46].

Assessing various BioRoot RCS[®] proportions in the ink formulation (1:5 and 1:20) led to slight differences in rheological behavior of the MI. Notably, with lower concentration (0.25 g ml^{-1}) of BioRoot RCS[®], MI had a higher LVR due to a lesser granularity of the ink, but led to messy printing, with merging phenomena in the patterns assessed. With twice the concentration (1 g ml^{-1}) of BioRoot RCS[®] in

MI, the resulting viscosity increased drastically (by 3.2-fold) and gave the material a thixotropic behavior. However, this high concentration was found to be challenging to collect with a pipette and to spray homogeneously on the gold-coated ‘donor’ slide, resulting in unpredictable printing outcomes due to instability of the bubble cavitation, resulting in variability of the jet formation [47, 48]. To sum it up, placing 1:20 or 1:5 proportions of BioRoot RCS[®] in MI resulted in poor printing outcomes, meanwhile the 1:10 proportion was the best balance between resolution and pattern fidelity.

Those results questioned the determination of the ideal concentration of bioactive agent in an ink for bone repair. Standardized analysis of rheological should be performed at early stage of the development of the formulation of candidate including the capability for extrusion or laser based bioprinting as those technology emerge as promising tools for bone regeneration.

The ink formulation was then achieved and both *in vitro* and *in vivo* evaluations of the effects of this MI

on cell viability, differentiation potential, migratory capacities, neo-vascularization and tissue mineralization were investigated.

Although BioRoot RCS[®] was found to be cytotoxic at manufacturer concentration [49], it was described to be non-cytotoxic at a 1:2 dilution [50]. This finding was contested, referring to an absence of cell viability loss starting at 1:8 dilution at day 7 [51]. Other results based on the material extracts claimed that BioRoot RCS[®] had no cytotoxic effect regardless its dilution [52]. Hence, the least dilution compatible with satisfying LAB efficiency process here was 1:10. To comply to previously studied models [12], the initial strategy was to use the elaborated MI in association with HUVECs and SCAPs. To assess cytotoxicity, a supernatant metabolic assay [53] was preferred due to the fact that cells were printed on a collagen hydrogel. It was therefore difficult to retrieve the printed cells to perform a reliable cell counting, and cell proliferation was assumed to be equivalent to control, since the same amount of cells were printed in each condition at the start of the experiment. *In vitro*, even though literature suggested that BioRoot RCS[®] might induce angiogenesis [54], zirconium oxide (ZrO₂) (which accounts for 5% of BioRoot RCS[®] powder composition, according to the manufacturer), was reported to have a cytotoxic effect on HUVECs (figure S2) [27] but did not affect SCAPs metabolism, whatever the applied quantity. Thus, only the influence of LAB-delivered dose of MI was assessed for the rest of the experimental study. ALP activity investigation remains a universal test for osteogenic differentiation studies and a useful tool to predict *in vivo* outcome [55]. Here, ALP activity levels found in the different culture conditions were comparable to others found in MSCs [56]. It appeared that SCAPs ALP activity was not modulated by the presence of MI in standard culture conditions. The fact that ALP raised significantly on day 14 only when SCAPs were cultured with osteogenic pro-differentiating medium suggested a lack of differentiating cell population triggered by MI presence. However, the final osteogenic differentiation step is the acquisition of a mineral matrix secretion phenotype, and the quantification of this phenotype expression remains necessary to evaluate cell differentiation. Hence, regarding differentiation potential of SCAPs, the presence of tricalcium within the ink rose great concern for monitoring hydroxyapatite synthesis without the bias of measuring the calcium trapped within the ink. The Osteoimage[®] assay was chosen rather than a von Kossa [57] or an Alizarin Red staining [58] for being able to bring quantitative results with a nanohydroxyapatite specificity [59]. Other complementary techniques, yet not quantitative, could be performed to formally identify presence of hydroxyapatite [60]. In the differentiation assay, having MI surrounding cells led to an early synthesis of nanohydroxyapatite nodules.

This result is consistent with literature, as the use of ZrO₂ was reported [28] to enhance osteogenic differentiation in mesenchymal derived cells. Indeed, a minimal 50 μ M Zr ions concentration was correlated to the upregulation of osteogenic-related lineages differentiation genes and an increase in calcium phosphate deposition by osteoblasts. In our MI composition, the ZrO₂ final concentration has been estimated at 20 mM; therefore, this result could be explained by a signaling burst mediated by the ZrO₂ leachate of the ink, influencing the cells among the heterogenous population of SCAPs that were already engaged towards osteogenic lineages. Different signaling pathways might have been upregulated by the BioRoot RCS[®], as reported in literature [61, 62], leading to these results. However, compared to the impact of an osteogenic differentiation medium on nanohydroxyapatite synthesis, the relevance of this result is to be considered cautiously. Further investigations on a biomolecular level could unveil the involved signaling mechanisms and bring a higher comprehension of the effect of the MI on SCAPs at an intracellular scale, but were considered needless in this study considering the difference in mineralizing phenotypes induced with differentiation medium. Regarding migration properties, cell speed was found to be enhanced by the presence of MI, at a least distance of 1600 μ m from cells, the highest investigated here. The mean speeds recorded were consistent with cell migration speed described in literature for mesenchymal cells [63, 64]. Larger distances or even transwell assays would be interesting for further investigations. First observations suggested that MI might have represented an obstacle, restraining cells in a spatially defined environment, rising concerns regarding host cells ability to colonize the defect site and participate to the repair process. Further analysis demonstrated that 2D cell spreading behavior was not affected by the presence of MI printed as a 'confining fence' around SCAPs, but also showed that cells were not specifically attracted to MI. From the results obtained, it is strongly hypothesized that the leachate released by the set ink homogeneously within culture supernatant triggered rise in cell motility without influencing cell mobility. Culture media being changed every two days, a closer follow up of evacuated elements in the supernatant could be envisaged.

The *in vitro* cytotoxic effect of the MI observed on HUVECs did not seem to affect the *in vivo* neo-vascularization process, as the vessel density found at the cicatricial tissue was equivalent to the control condition without MI. The extracellular matrix may have exerted a protective role for the endothelial progenitors recruited to initiate the vascularization process [65], or natural tissue perfusion [66] helped to buffer, or evacuate the MI leachate. The mineralized volume formed at the site of the defect remained consistent with reported control BV/TV values in mice [67]. Using MI, regardless of the quantity delivered *in situ*

in the critical size defect, did not lead to a significant higher level of mineralization of the cicatricial tissue compared to control. The quantity of MI deposited to fill the entire volume of the defect (pipette deposit) was more efficient to induce tissue mineralization than LAB associated quantity of MI, suggesting a dose/effect of MI.

The two MI-SCAPs associated patterns studied here were designed according to several hypothesis: in both cases, the idea was to occupy part of the defect area as a 'void-filler' role, resulting in a solid scaffold with the ability to locally enhance osteogenic oriented cells delivered with LAB and from the host, triggering a faster and more efficient bone regeneration. The choice of a MI disc at the center of the defect was to leave a minimal gap of void (~1 mm) at the periphery of the defect, with the presence of SCAPs as a ring to both colonize the proximal host tissue and the solid MI. The second pattern was the peripheral MI ring with a central disc of SCAPs, for which it was hypothesized that having a central but artificially reduced area of void ($\varnothing \sim 2$ mm) would lead to an enhanced nanohydroxyapatite deposit by colonization of SCAPs on the peripheral substrate offered by the deposition of MI, easing the remodeling of the biomaterial at the edges of the defect, with the proximity of a vascularized system. Although the bone repair obtained with the MI-SCAPs association was not found to be efficient compared to the control group, based on the *in vivo* results, the observed tendency encourages to further investigate the pattern incidence, for a large difference in the median value between the two patterns in the BVF outcome was noticed.

Previous results [12] demonstrated the positive impact of endothelial progenitor cells deposits at the defect site upon induction of mineralization, confirming the tight relationship between vascularization and bone repair processes [68]. The results obtained were more significant than those with the hereby use of MI. It is hypothesized that beyond the osteogenic enhancing properties sought in the development of this ink, further formulations should be balanced with the pursuit of vascular-advantageous compounds, keeping *in situ* gelation with higher stiffness as a major objective.

5. Conclusion

This study confirmed the necessity, when developing a new ink, to consider all aspects of the formulation: rheological impact, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation according to the aimed model. Thus, we designed an original ink formulation candidate based on BioRoot RCS®, oriented towards tissue mineralization and compatible with LAB requirements. This study suggested that, in spite of great compatibility with its associated laser bioprinter, a potential for bone tissue engineering supported by literature evidence, with the ability to

deliver *in situ* microliters or nanoliters of active compounds thanks to LAB, this ink formulation was not successful to demonstrate a strong regenerative potential in a mouse calvaria critical defect model. *In vivo* results illustrated hurdles that have to be overcome to conciliate mechanical and biological objectives. Standardized protocols and models, at each level of development (*in vitro* and *in vivo*), could be defined to allow comparison regardless biofabrication approaches used. However, the results obtained here strengthened the ink development approach, and helped to assess multiple hypothesis. Further studies shall focus on improving the ink by adjusting its formulation.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available upon reasonable request from the authors.

Acknowledgments

We thank Dr H Boeuf (Inserm U1026 Biotis) for the generous gifts of UBx-SCAP cells (N1, N2, N3 and N4). The authors also thank Dr S Al-Bourgol (Alphanov), his team and Alphanov facility for hosting the SEM/EDS experiments with their TECSAN device.

This work was supported by grants from « Fondation des Gueules Cassées », Paris—France, « Fondation de l'Avenir », Paris—France, « Institut Français pour la Recherche Odontologique », and « Société Odontologique de Paris » (Bourse Michel Degrange).

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest related to this work.

ORCID iDs

Nicolas Touya  <https://orcid.org/0000-0003-0140-6371>

Naïma Ahmed Omar  <https://orcid.org/0000-0002-6387-4640>

Nathalie Dusserre  <https://orcid.org/0000-0002-4699-3365>

Hugo De Oliveira  <https://orcid.org/0000-0002-9715-8052>

Olivia Kérourédan  <https://orcid.org/0000-0001-7967-5569>

Raphaël Devillard  <https://orcid.org/0000-0002-2962-2044>

References

- [1] Iaquinta M R, Mazzoni E, Bononi I, Rotondo J C, Mazziotta C, Montesi M, Sprio S, Tampieri A, Tognon M and Martini F 2019 Adult stem cells for bone regeneration and repair *Front. Cell Dev. Biol.* **7** 268

- [2] Rosset P, Deschaseaux F and Layrolle P 2014 Cell therapy for bone repair *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **100** S107–12
- [3] Knight M N and Hankenson K D 2013 Mesenchymal stem cells in bone regeneration *Adv. Wound Care* **2** 306–16
- [4] Kumar S 2014 Bone defect repair in mice by mesenchymal stem cells *Animal Models for Stem Cell Therapy Methods in Molecular Biology* ed B Christ, J Oerlecke and P Stock (Berlin: Springer) pp 193–207
- [5] Harris J S, Bemenderfer T B, Wessel A R and Kacena M A 2013 A review of mouse critical size defect models in weight bearing bones *Bone* **55** 241–7
- [6] Khojasteh A, Eslaminejad M B and Nazarian H 2008 Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **106** 356–62
- [7] Agacayak S, Gulsun B, Ucan M C, Karaöz E and Nergiz Y 2012 Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **16** 679–86
- [8] Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan R S, Wang S, Shi S and Huang G T-J 2008 Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study *J. Endod.* **34** 166–71
- [9] Saberi E, Farhad-Mollashahi N, Sargolzaei Aval F and Saberi M 2019 Proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation, and cytokine production by human stem cells of the apical papilla induced by biomaterials: a comparative study *Clin. Cosmet. Invest. Dent.* **11** 181–93
- [10] Rodas-Junco B A and Villicaña C 2017 Dental pulp stem cells: current advances in isolation, expansion and preservation *Tissue Eng. Regen. Med.* **14** 333–47
- [11] Kang J, Fan W, Deng Q, He H and Huang F 2019 Stem cells from the apical papilla: a promising source for stem cell-based therapy *Biomed. Res. Int.* **2019** e6104738
- [12] Kérourédan O, Hakobyan D, Rémy M, Ziane S, Dusserre N, Ericain J-C, Delmond S, Thébaud N B and Devillard R 2019 *In situ* prevascularization designed by laser-assisted bioprinting: effect on bone regeneration *Biofabrication* **11** 045002
- [13] Guillotin B et al 2010 Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization *Biomaterials* **31** 7250–6
- [14] Zhao W and Chang J 2004 Sol–gel synthesis and *in vitro* bioactivity of tricalcium silicate powders *Mater. Lett.* **58** 2350–3
- [15] Dimitrova-Nakov S, Uzunoglu E, Ardila-Osorio H, Baudry A, Richard G, Kellermann O and Goldberg M 2015 *In vitro* bioactivity of BioRoot™ RCS, via A4 mouse pulpal stem cells *Dent. Mater.* **31** 1290–7
- [16] Loison-Robert L S, Tassin M, Bonte E, Berbar T, Isaac J, Berdal A, Simon S and Fournier B P J 2018 *In vitro* effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis *PLoS One* **13** e0190014
- [17] Cuesta A, Zea-García J D, Londono-Zuluaga D, de la Torre A G, Santacruz I, Vallcorba O, Dapiaggi M, Sanfélix S G and Aranda M A G 2018 Multiscale understanding of tricalcium silicate hydration reactions *Sci. Rep.* **8** 8544
- [18] Yamamoto S, Han L, Noiri Y and Okiji T 2017 Evaluation of the Ca ion release, pH and surface apatite formation of a prototype tricalcium silicate cement *Int. Endod. J.* **50** e73–e82
- [19] Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C and Gandolfi M G 2017 Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate *Int. Endod. J.* **50** e120–36
- [20] Ali M R W, Mustafa M, Bårdsen A and Bletsa A 2019 Tricalcium silicate cements: osteogenic and angiogenic responses of human bone marrow stem cells *Eur. J. Oral Sci.* **127** 261–8
- [21] Eid A A, Hussein K A, Niu L, Li G, Watanabe I, Al-Shabraway M, Pashley D H and Tay F R 2014 Effects of tricalcium silicate cements on osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro Acta Biomater.* **10** 3327–34
- [22] Rathinam E, Govindarajan S, Rajasekharan S, Declercq H, Elewaut D, de Coster P, Martens L and Leybaert L 2021 The calcium dynamics of human dental pulp stem cells stimulated with tricalcium silicate-based cements determine their differentiation and mineralization outcome *Sci. Rep.* **11** 645
- [23] Jung Y, Yoon J-Y, Dev Patel K, Ma L, Lee H-H, Kim J, Lee J-H and Shin J 2020 Biological effects of tricalcium silicate nanoparticle-containing cement on stem cells from human exfoliated deciduous teeth *Nanomaterials* **10** 1373
- [24] Kebudi Benezra M, Schembri Wismayer P and Camilleri J 2017 Influence of environment on testing of hydraulic sealers *Sci. Rep.* **7** 17927
- [25] González-Vázquez A, Planell J A and Engel E 2014 Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells *Acta Biomater.* **10** 2824–33
- [26] Lee M N, Hwang H-S, Oh S-H, Roshanzadeh A, Kim J-W, Song J H, Kim E-S and Koh J-T 2018 Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression *Exp. Mol. Med.* **50** 1–16
- [27] Lupu-Haber Y, Pinkas O, Boehm S, Scheper T, Kasper C and Machluf M 2013 Functionalized PLGA-doped zirconium oxide ceramics for bone tissue regeneration *Biomed. Microdevices* **15** 1055–66
- [28] Chen Y, Roohani-Esfahani S-I, Lu Z, Zreiqat H and Dunstan C R 2015 Zirconium ions up-regulate the BMP/SMAD signaling pathway and promote the proliferation and differentiation of human osteoblasts *PLoS One* **10** e0113426
- [29] Elyassi Y, Moïnzadeh A T and Kleverlaan C J 2019 Characterization of leachates from 6 root canal sealers *J. Endod.* **45** 623–7
- [30] Rémy M, Ferraro F, le Salver P, Rey S, Genot E, Djavaheri-Mergny M, Thébaud N, Boiziau C and Boeuf H 2019 Isolation and culture of human stem cells from apical papilla under low oxygen concentration highlight original properties *Cells* **8** E1485
- [31] Thébaud N B, Aussel A, Siadous R, Toutain J, Bareille R, Montembault A, David L and Bordenave L 2015 Labeling and qualification of endothelial progenitor cells for tracking in tissue engineering: an *in vitro* study *Int. J. Artif. Organs* **38** 224–32
- [32] Bordenave L, Baquey C, Bareille R, Lefebvre F, Lauroua C, Guerin V, Rouais F, More N, Vergnes C and Anderson J M 1993 Endothelial cell compatibility testing of three different Pellethanes *J. Biomed. Mater. Res.* **27** 1367–81
- [33] Kérourédan O, Bourget J-M, Rémy M, Crauste-Manciet S, Kalisky J, Catros S, Thébaud N B and Devillard R 2019 Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by laser-assisted bioprinting *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **30** 28
- [34] Devillard R, Pagès E, Correa M M, Kériquel V, Rémy M, Kalisky J, Ali M, Guillotin B and Guillemot F 2014 Cell patterning by laser-assisted bioprinting *Methods Cell Biol.* **119** 159–74
- [35] de Chaumont F et al 2012 Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research *Nat. Methods* **9** 690–6
- [36] Schneider C A, Rasband W S and Eliceiri K W 2012 NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis *Nat. Methods* **9** 671–5
- [37] Reszka P, Nowicka A, Lipski M, Dura W, Drożdżik A and Woźniak K 2016 A comparative chemical study of calcium silicate-containing and epoxy resin-based root canal sealers *Biomed. Res. Int.* **2016** 9808432
- [38] Chen K, Xiong H, Huang Y and Liu C 2013 Comparative analysis of *in vitro* periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs) *Arch. Oral Biol.* **58** 997–1006
- [39] Sun W et al 2020 The bioprinting roadmap *Biofabrication* **12** 022002

- [40] O'Connell C, Ren J, Pope L, Li Y, Mohandas A, Blanchard R, Duchi S and Onofrillo C 2020 Characterizing bioinks for extrusion bioprinting: printability and rheology *Methods Mol. Biol.* **2140** 111–33
- [41] Hölzl K, Lin S, Tytgat L, Vlierberghe S V, Gu L and Ovsianikov A 2016 Bioink properties before, during and after 3D bioprinting *Biofabrication* **8** 032002
- [42] Chopin-Doroteo M, Mandujano-Tinoco E A and Krötzsch E 2021 Tailoring of the rheological properties of bioinks to improve bioprinting and bioassembly for tissue replacement *Biochim. Biophys. Acta* **1865** 129782
- [43] Paxton N, Smolan W, Böck T, Melchels F, Groll J and Jungst T 2017 Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability *Biofabrication* **9** 044107
- [44] Yen M-H, Chen Y-H, Liu Y-S and Lee O K-S 2020 Alteration of Young's modulus in mesenchymal stromal cells during osteogenesis measured by atomic force microscopy *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **526** 827–32
- [45] Titushkin I and Cho M 2007 Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells *Biophys. J.* **93** 3693–702
- [46] Jaunich M, Raje S, Kim K, Mitra K and Guo Z 2008 Bio-heat transfer analysis during short pulse laser irradiation of tissues *Int. J. Heat Mass Transfer* **51** 5511–21
- [47] Zhang Z, Xiong R, Mei R, Huang Y and Chrisey D B 2015 Time-resolved imaging study of jetting dynamics during laser printing of viscoelastic alginate solutions *Langmuir* **31** 6447–56
- [48] Zhang Z, Xiong R, Corr D T and Huang Y 2016 Study of impingement types and printing quality during laser printing of viscoelastic alginate solutions *Langmuir* **32** 3004–14
- [49] Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M and Pietrocola G 2017 Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers *J. Clin. Exp. Dent.* **9** e574–8
- [50] Jung S, Sielker S, Hanisch M R, Libricht V, Schäfer E and Dammaschke T 2018 Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts *PLoS One* **13** e0194467
- [51] Alsubait S A, Al Ajlan R, Mitwalli H, Aburaisi N, Mahmood A, Muthurangan M, Almadhri R, Alfayez M and Anil S 2018 Cytotoxicity of different concentrations of three root canal sealers on human mesenchymal stem cells *Biomolecules* **8** 68
- [52] Gaudin A, Tolar M and Peters O A 2020 Cytokine production and cytotoxicity of calcium silicate-based sealers in 2- and 3-dimensional cell culture models *J. Endod.* **46** 818–26
- [53] Rampersad S N 2012 Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays *Sensors* **12** 12347–60
- [54] Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P and About I 2015 Bioactivity of a calcium silicate-based endodontic cement (BioRoot RCS): interactions with human periodontal ligament cells *in vitro* *J. Endod.* **41** 1469–73
- [55] Prins H-J, Braat A K, Gawlitta D, Dhert W J A, Egan D A, Tijssen-Slump E, Yuan H, Coffey P J, Rozemuller H and Martens A C 2014 *In vitro* induction of alkaline phosphatase levels predicts *in vivo* bone forming capacity of human bone marrow stromal cells *Stem Cell Res.* **12** 428–40
- [56] Bidarra S, Barrias C, Barbosa M, Soares R, Amédée J and Granja P 2011 Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells *Stem Cell Res.* **7** 186–97
- [57] Bonewald L F, Harris S E, Rosser J, Dallas M R, Dallas S L, Camacho N P, Boyan B and Boskey A 2003 von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization *in vitro* represents bone formation *Calcif. Tissue Int.* **72** 537–47
- [58] Puchtler H, Meloan S N and Terry M S 1969 On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium *J. Histochem. Cytochem.* **17** 110–24
- [59] Wang Y-H, Liu Y, Maye P and Rowe D W 2006 Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes *Biotechnol. Prog.* **22** 1697–701
- [60] Lu H B, Campbell C T, Graham D J and Ratner B D 2000 Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS *Anal. Chem.* **72** 2886–94
- [61] Rathinam E, Rajasekharan S, Chitturi R T, Declercq H, Martens L and de Coster P 2016 Gene expression profiling and molecular signaling of various cells in response to tricalcium silicate cements: a systematic review *J. Endod.* **42** 1713–25
- [62] Sanz J L, Rodríguez-Lozano F J, Lopez-Gines C, Monleon D, Llana C and Forner L 2021 Dental stem cell signaling pathway activation in response to hydraulic calcium silicate-based endodontic cements: a systematic review of *in vitro* studies *Dent. Mater.* **37** e256–68
- [63] Zhao Z, Watt C, Karystinou A, Roelofs A J, McCaig C D, Gibson I R and de Bari C 2011 Directed migration of human bone marrow mesenchymal stem cells in a physiological direct current electric field *Eur. Cell Mater.* **22** 344–58
- [64] Bear J E and Haugh J M 2014 Directed migration of mesenchymal cells: where signaling and the cytoskeleton meet *Curr. Opin. Cell Biol.* **0** 74–82
- [65] Frantz C, Stewart K M and Weaver V M 2010 The extracellular matrix at a glance *J. Cell Sci.* **123** 4195–200
- [66] Tomlinson R E and Silva M J 2013 Skeletal blood flow in bone repair and maintenance *Bone Res.* **1** 311–22
- [67] Samsanraj R M, Dudakovic A, Zan P, Pichurin O, Cool S M and van Wijnen A J 2017 A versatile protocol for studying calvarial bone defect healing in a mouse model *Tissue Eng. C* **23** 686–93
- [68] Gerber H P and Ferrara N 2000 Angiogenesis and bone growth *Trends Cardiovasc. Med.* **10** 223–8

3.3.3 Conclusion

Cette étude a confirmé la nécessité, lors du développement d'une nouvelle encre, de considérer tous les aspects de la formulation : impact rhéologique, caractérisation *in vitro* et évaluation *in vivo* selon le modèle cible. Ainsi, nous avons conçu une formulation originale d'une encre basée sur le BioRoot RCS®, orientée vers l'amélioration de la minéralisation du tissu cible et compatible avec les exigences de LAB. Cette étude a suggéré que, malgré une grande compatibilité avec la station d'impression laser associée, et un potentiel pour l'ingénierie du tissu osseux étayé par la littérature, avec la capacité de délivrer *in situ* des microlitres ou des nanolitres de composés actifs grâce à la bio impression assistée par laser, cette formulation d'encre a échoué à démontrer un grand potentiel de régénération dans un modèle de défaut critique de la calvaria de la souris. Les résultats *in vivo* ont illustré les obstacles à surmonter afin de concilier les enjeux mécaniques et biologiques. Des protocoles et des modèles standardisés, à chaque niveau de développement (*in vitro* et *in vivo*), pourraient être définis pour permettre la comparaison entre les différentes approches de biofabrication utilisées. Toutefois, les résultats obtenus ici ont renforcé l'approche du développement de l'encre, et ont permis d'évaluer plusieurs hypothèses. Les travaux futurs pourraient se concentrer sur l'amélioration de l'encre en ajustant la formulation.

Chapitre 4

Applications transversales du laser au service de l'ingénierie du tissu osseux

4.1 Le laser comme outil de découpe

L'usage de la technologie LASER en tant qu'outil de découpe [276] remonte à la fin des années 1960 [277–279]. L'évolution des lasers a permis le développement de différentes approches selon la longueur d'onde employée [280]. À source et dispositif laser équivalents, les paramètres d'usinage de différents matériaux furent également étudiés [281]. Ces investigations ont permis d'affiner les dispositifs laser et de les transposer au domaine médical pour permettre de répondre à des besoins thérapeutiques [282]. Ainsi, la technologie laser évolue et est appliquée dans divers domaines de la médecine [283] (Figure 39) depuis la première application médicale rapportée en 1962 dans une étude dédiée à la coagulation rétinienne [284].

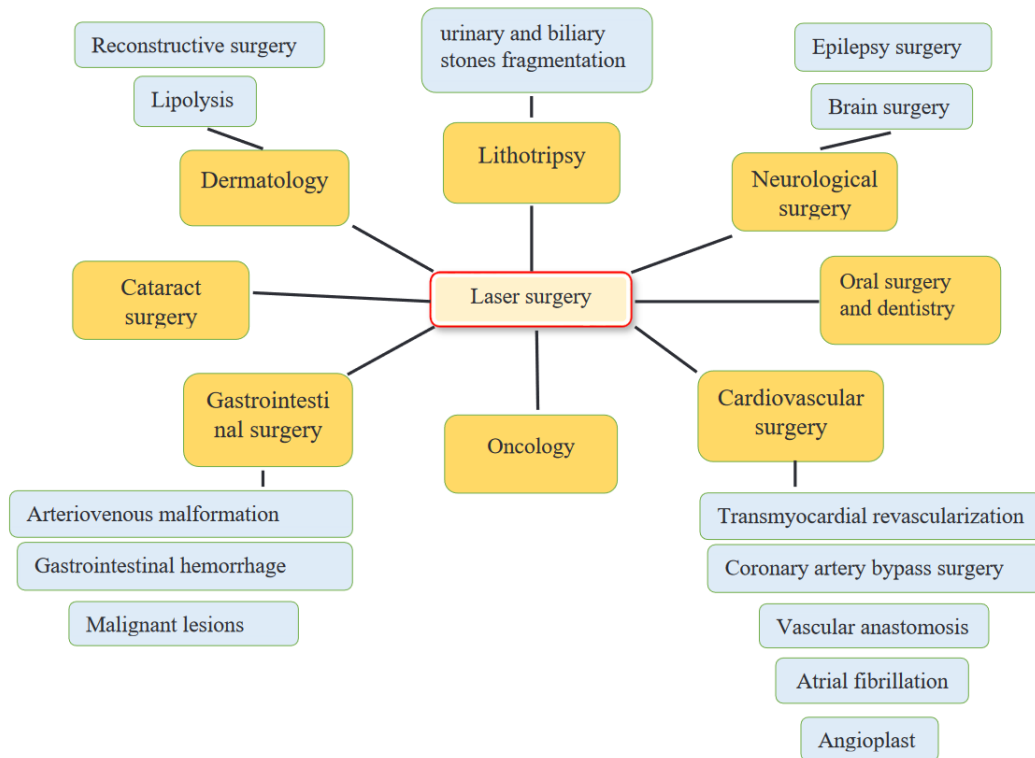


Figure 39: Les applications médicales de la technologie laser, de Khalkhal *et al.* [282]

Dans les tissus durs et la chirurgie à haute résolution, le laser est généralement associé à un outil d'ablation pour la destruction ou le retrait d'éléments indésirables, incluant les tissus tumoraux [285]. Deux problèmes majeurs sont cependant associés à l'utilisation de cet outil : l'échauffement thermique potentiellement engendré par l'utilisation de lasers hautement énergétiques, et la performance intrinsèque de découpe du tissu osseux. Le taux d'ablation dépend de la source laser [286] et de la composition locale du tissu notamment en eau et en pigments présents [287].

4.2 Le laser comme outil de texturation

Bien que présenté comme un outil de découpe, de nombreuses applications industrielles emploient le laser comme outil de texturation de surface par gravure [288–290]. Le domaine biomédical n'a pas dérogé à l'exploration de la versatilité de cet outil [291]. L'ingénierie tissulaire a ainsi adapté la technologie laser pour créer des textures grâce à la propriété du laser de décomposer la matière, et l'a appliqué à l'ingénierie tissulaire osseuse [292]. En effet, la modification de surface est l'une des approches de l'ingénierie tissulaire [293, 294] pour améliorer l'ostéointégration des implants, influencer le phénotype des cellules pour favoriser l'adhésion ou la différenciation [295], ou au contraire prévenir l'adhésion cellulaire [296] (Figure 40).

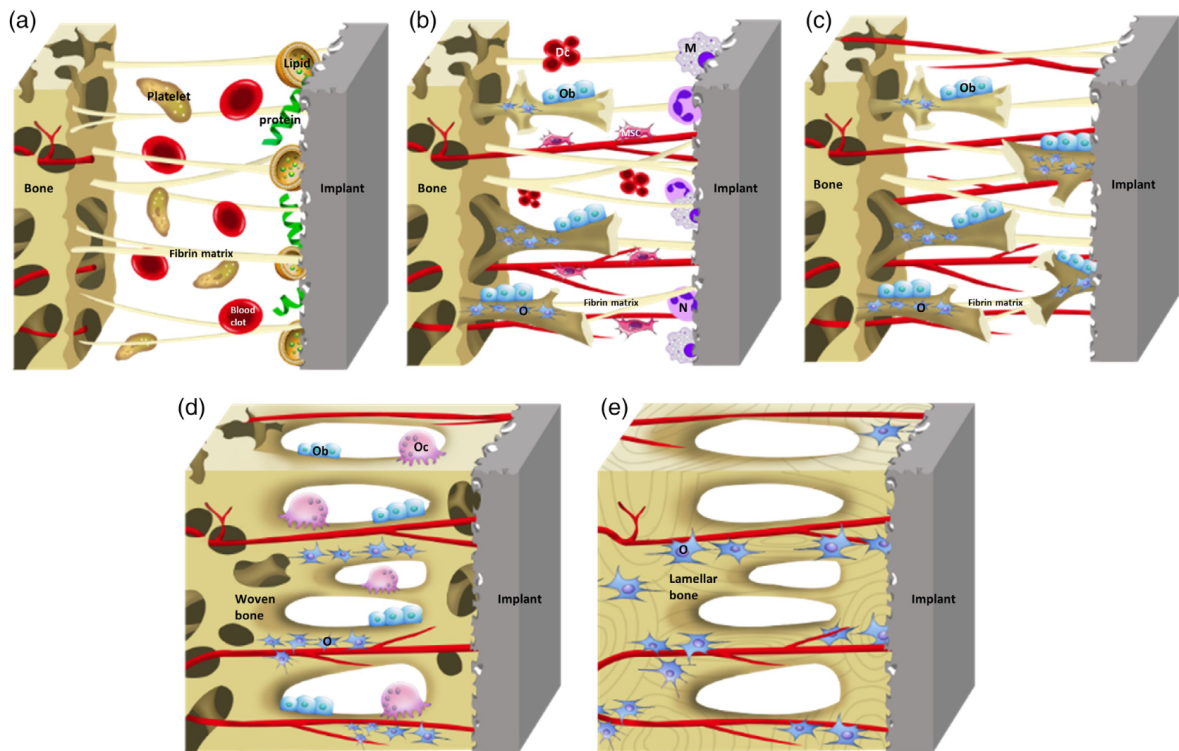


Figure 40: Interface implant/tissu osseux, Liu *et al.* [297]

Selon les dimensions choisies pour apporter une modification du relief de l'implant, les conséquences sur les propriétés et interactions physiques [298] et biologiques qui en découlent sont différentes [292, 299]. C'est aux échelles micro et nanométriques (Figure 41) que l'interaction avec les éléments du vivants sont les plus fortes, avec l'apparition de reliefs aux dimensions des corps cellulaires.

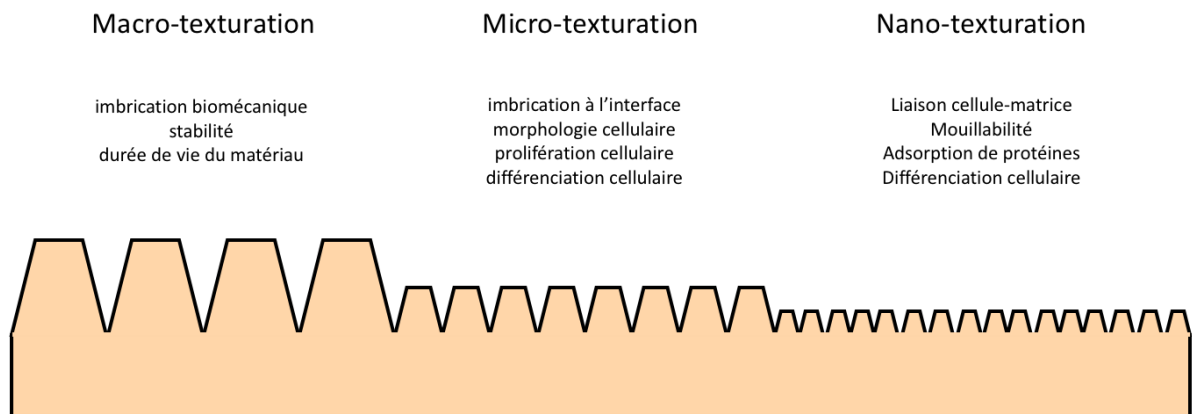


Figure 41: Les paramètres modulés par le recours à la texturation à différentes échelles, adapté de Sirdeshmukh *et al.* [292]

Des recherches ont été menées sur l'impact de lasers sur différents matériaux syn-

thétiques destinés à substituer le tissu osseux : céramique [300–302], métal [303–306], plastique [307]... Une expérience *in vivo* a souligné l'intérêt stratégique de la modification de la topographie des implants par laser, en montrant une augmentation de la formation osseuse et une liaison os-implant plus forte [308]. Pourtant, jusqu'à présent, aucune publication n'a été consacrée à la texturation osseuse directe afin de synergiser et promouvoir les résultats positifs observés par la modification des surfaces des implants.

4.3 Utilisation de la technologie laser pour texturer du tissu osseux : vers une nouvelle vision de l'interface os-implant

4.3.1 Introduction

L'interface os-implant a été largement étudiée dans la littérature pour optimiser la surface du substitut destiné à être greffé au tissu osseux afin d'en améliorer l'ostéointégration [300–307]. Cependant, à notre connaissance, aucune recherche n'a été menée avec la perspective de modifier la surface du tissu osseux destinée à être en contact avec l'implant (Figure 42).

Dans cette étude, la question de la texturation osseuse pour potentialiser les applications biomédicales actuelles et futures a été placée au centre de notre réflexion, avec la création d'un modèle *in vitro* de fémur de porc usiné par laser.

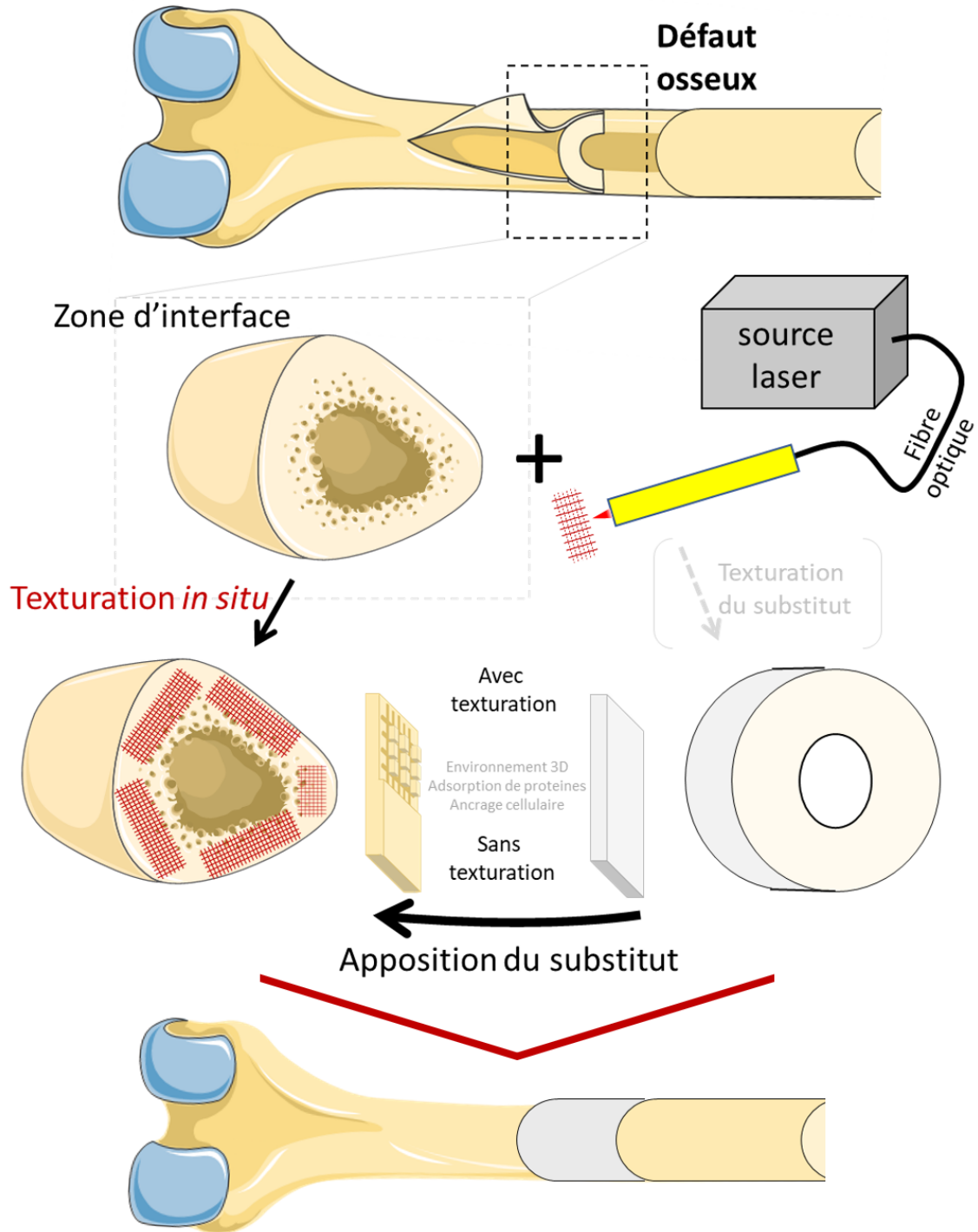


Figure 42: Concept d'application d'une texturation laser *in situ* pour la création d'une interface os-implant

4.3.2 [Pre-print] Original article: "Bone laser patterning to decipher cells organization"

Pre-article: Bone laser patterning to decipher cells organization

Submitted in ACS Applied Materials & Interfaces 18/10/22

Nicolas Touya¹, Samy Al-Bourgol², Théo Désigaux¹, Olivia Kérourédan^{1,3,4}, Laura Gemini², Rainer Kling², Raphaël Devillard^{1,3,4}

¹Univ. Bordeaux, INSERM, BIOTIS, U1026, F-33000 Bordeaux, France

²ALPhANOV, Bordeaux, France;

³Faculty of Dentistry, University of Bordeaux, France;

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

E-mail: nicolas.touya@u-bordeaux.fr

Received xxxxxx

Accepted for publication xxxxxx

Published xxxxxx

Abstract

Laser patterning of implant materials for bone tissue engineering purposes has shown to be a promising technique to control cell properties such as adhesion or differentiation, resulting in an enhanced osteointegration. However, the perspective of patterning the bone tissue side interface to generate microstructure effects has never been investigated. In the present study, three different laser-generated patterns were machined on the bone surface with the aim to identify the best surface morphology compatible with osteogenic-related cells recolonization. The laser patterned bone tissue was characterized by electron scanning microscopy and confocal microscopy in order to obtain a comprehensive picture of the bone surface morphology. Cortical bone patterning impact upon cell compatibility and cytoskeleton rearrangement to the patterned surfaces was performed with Stromal Cells from Apical Papilla (SCAPs). Results indicated that laser machining had no detrimental effect upon consecutively seeded cells metabolism. Orientation assays revealed that surface patterning characterized by larger hatch distances was correlated with a higher cell cytoskeletal conformation to the laser-machined patterns. For the first time, to our knowledge, bone is considered and assessed here as a potentially engineered-improvable biological interface. Further studies shall focus on *in vivo* implications of this direct patterning.

Keywords: femtosecond laser, laser patterning, bone tissue, tissue engineering

1. Introduction

In the last years, surface modification has become a critical aspect of tissue engineering [1,2] to improve osteointegration of implants and influence cell fate [3]. Investigations were led over various synthetic materials designed to substitute bone tissue as prostheses, such as ceramic [4–6], metal [7–10], and polymers [11]. An *in vivo* study outlined the strategical interest of modifying the topography of implants with laser, by showing a stronger bone-to-implant bond [12]. Femtosecond (fs) lasers particularly allow the biological response tailoring of a surface morphology by controlling surface pattern geometry down to 100s-nm scale [13–15], thanks to their unique characteristic. Indeed, Ultra Short Pulses (USP) allow a quasi-non-thermal interaction with materials and the generation of interference-based physical phenomena [16]. For example, Carvalho *et al.* reported an increased metabolic activity of MC3T3 (osteoblastic-related cells) cultured on Alumina toughened Zirconia (ATZ) where grid-structures or groove-like structures were generated upon fs laser machining; Gnilitzkiy *et al.* demonstrated a higher ratio of HDFa (fibroblast cells) growth on both laser-nanostructured titanium alloy and zirconium, showing the predominant role of surface morphology over the material type for these types of biological response; A similar result was achieved by Lee *et al.*, where a variation of Saos-2 (osteoblastic-related cells) response and surface biocompatibility was observed down to a few 100s-nm pattern size difference.

Due to these unique characteristics, these types of laser sources are currently considered in the frame of ablation of bone tissue for applications in surgeries where it is fundamental (i) to preserve the healthy status of the tissue after treatment to improve its biological response, such as implant integration, and (ii) to reach high-resolution modification of the tissue, as for instance in specific maxillofacial surgery approaches. A few reports showed the possibility to avoid detrimental thermal effect on bone tissue after UPS laser ablation, cutting and drilling [17,18]. Detrimental effects linked to thermal accumulation, such as the presence of microparticles of melted tissue and calcined tissue, were reported to be visible on the bone tissue down to the nanosecond (ns) regime of laser-tissue interaction and to become negligible for laser pulse duration below a few ps and optimised laser process parameters [19].

In this context, while a very few reports on laser patterning of synthetic hydroxyapatite are available [20], to our knowledge, no reports are available in the literature dedicated to direct bone patterning by fs laser. This new aspect of tissue interface could promote osteointegration of grafts, and/or synergize with superior osteointegration of laser-treated implants. In this study, patterning bone to potentialize current and future biomedical applications was evaluated in an *in vitro* model, as a first step towards a possible development to next-generation strategies for the engineering of bone/implant interface.

2. Methods

2.1 Bone tissue supply

Porcine femurs were collected from the same place and labelled with the age and sex of the animals. All animals from which those femurs were retrieved were intended to human food consumption, in respect of French and European regulations regarding breeding, slaughter, and hygiene-sanitation in meat industry.

The bones were stored after reception in a freezer at a temperature of about -20 °C. To prepare the bone tissue for the laser treatment, it was left defrosting at room temperature in a laminar air-flow protection system (Thermo Scientific HERAsafe KS12, France). The proximal and distal epiphysis, as well as the metaphysis parts were then mechanically removed in order to obtain a clean cut of the diaphysis. Soft and fatty tissue, including bone marrow, were removed by scalpel. Finally, several samples (approx. 1x1x0.5 cm) were obtained (Figure 1) from the diaphysis by mechanical cutting using a diamond blade for easier handling during the processing and characterization steps. All bone samples were sanded by a mechanical sanding system (EcoMet 300, Buehler, USA). Their thickness, width and height were measured after sanding to ensure that all sample dimensions were homogeneous. In order to sterilize the tissue before laser processing, all samples were soaked in successive ethanol baths (24h at 90% concentration and 4h at 100% concentration, room temperature).

2.2 Laser-assisted patterning of bone

A Satsuma HP2 (Amplitude, Talence, France) was employed for all tests. The laser ran at a central wavelength of 1030 nm with a maximum average power of 40 W and pulse duration of about 350 fs. The laser beam was firstly sent through a half-wave plate coupled with a polarising cube for a fine control of the laser pulse energy and then through a telescope system to adjust the beam size before the focusing optics (Figure 1). The laser beam was deflected on the sample by a galvanotric scanning head (ScanCUBE, ScanLAB, Munich, Germany) and focused by a 100mm f-theta lens on the sample surface. For all tests the following process parameters were kept constant: laser repetition rate of 500 kHz, average power of 5.28 W and scanning speed of 4 m/s. The selection of the processing parameters was done according to results from the same group [16], which showed that in the selected process window it was possible to ablate the bone tissue without important thermal damage. A cross-hatch pattern was generated on the sample surface with hatch distance defined as the distance between two consecutive lines. Three different values of hatch distance were selected: $h=25; 45; 65 \mu\text{m}$. In order to achieve reliable and reproducible ablation depth values, the cross-hatch pattern was repeated 10 times for each tests. An aspiration system and an air-knife were employed to efficiently remove the bone debris and particules during laser ablation. The samples were placed on motorised stages for automated positioning before laser processing.

Sample preparation before biological assays

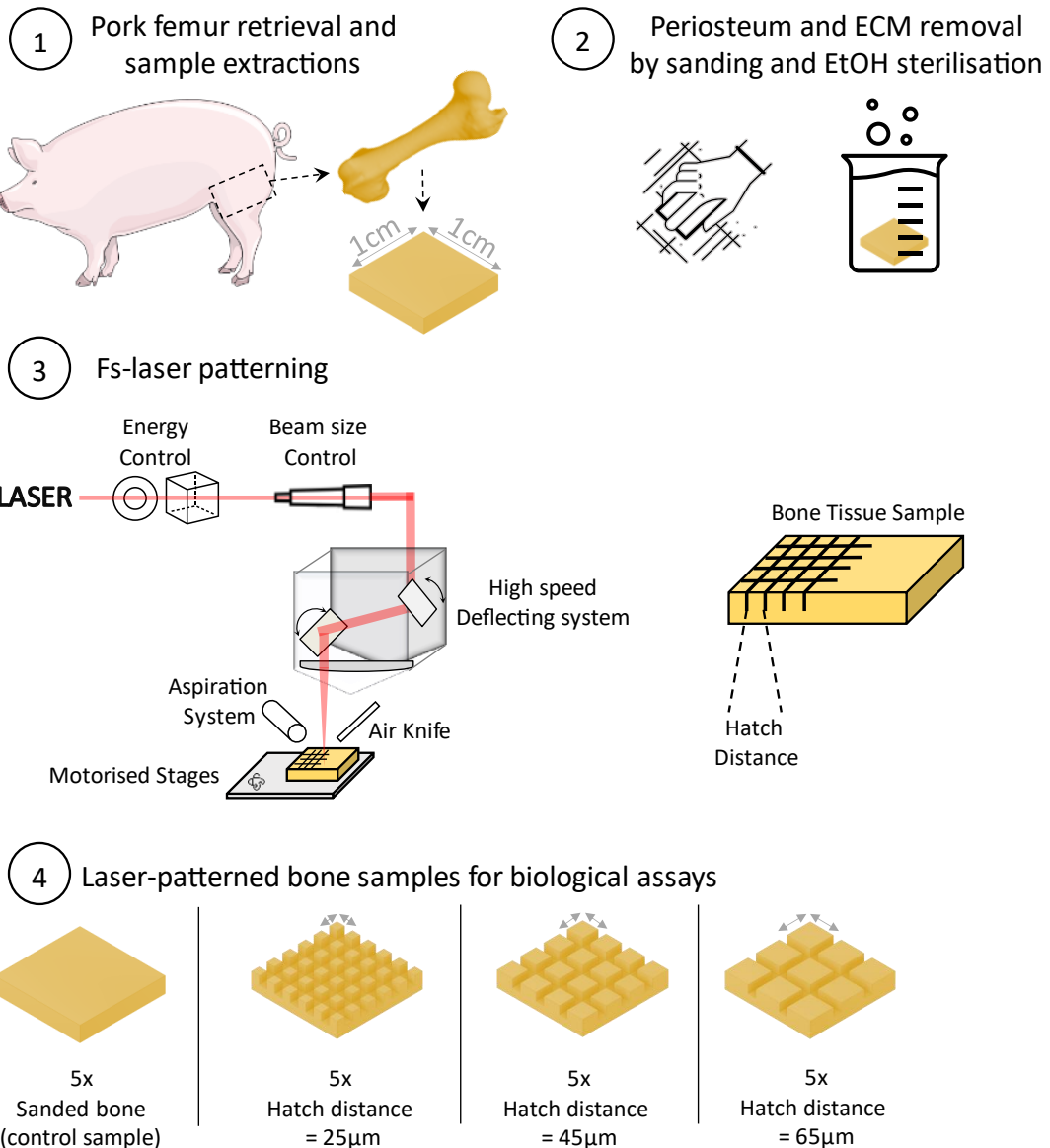


Figure 1 – Illustrated experimental approach and protocols for preparation of bone sample preparation before biological assays.

Profilometric assays were performed with software Confomap v8 according to methods described in ISO 5436.

2.3 Cell culture

The human Stromal Cells from Apical Papilla (SCAPs) used for the hereby experiments were taken from a batch of cells already characterized [21]. The cells were amplified and cultured under 21%O₂. Briefly, cells were derived from germs of third molars, obtained from young patients at the *Service de Médecine bucco dentaire du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux*. All experimental protocols were led following guidelines and regulations, under Ministerial approbation regarding french law ('DC-2008-412'; *convention INSERM-CHU de Bordeaux*). All patients gave their explicit consent to have their samples used for research purposes. If patients were under majority status regarding age, an additional consent from a parent and/or legal guardian was requested. Samples were treated anonymously. Freshly extracted teeth were placed in Minimum Essential Medium Alpha (α -MEM, Gibco, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 20% FBS and penicillin (100 U ml⁻¹)/streptomycin (100 μ g.ml⁻¹) (Life Technologies, SAS). Cells were extracted according to previously described method [22].

Dental apical papillae were digested in a mixture of 3mg.ml⁻¹ collagenase (Sigma-Aldrich) and 4 mg.ml⁻¹ dispase (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C. The obtained suspension was sifted through a 40µm hole-size nylon sieve (BD Biosciences, France) and cells were then seeded in a 75cm² culture flask (37°C, 5% CO₂). Non-adherent cells were removed after 2 days, and the medium was changed thrice a week until cells reached 95% confluence. All SCAPs were amplified or cultured in tissue culture flasks in α -MEM supplemented with 10% FBS, in a controlled atmosphere (5% CO₂, 95% Relative Humidity, 37°C). All cells were cultured and used for experimentations with a maximum passage number under 5.

2.4 Cells preparation

Cells were detached from the polystyrene tissue culture surface with a solution of trypsin-EDTA (0.05% 1X Gibco, UK). Cells were suspended in their respective culture media. The cell suspension concentration was adjusted to 10 million cells.ml⁻¹, according to previously described protocol [23].

2.5 Metabolic Assay

After being washed in culture medium, all samples were placed over 2% w/v agarose coated wells. An identical number of non-labeled cells (2000 cells.mm⁻²) were seeded over laser-machined areas and over non-machined samples. As control, some cells were seeded over uncoated wells. Media were renewed every two days, and observations were realized at days 1, 3, 5 and 7. Briefly, AlamarBlue™ [24] (0.1mg.ml⁻¹, Sigma-Aldrich, France) was diluted at 1:15 (v/v) in standard culture medium and placed with cells for 2h at 37°C. Supernatants were retrieved and transferred to a microplate while wells containing cells were rinsed, then refilled with standard culture medium and placed back to the incubator. Plate reading was performed with Varioskan Lux (Thermoscientific, US) spectrophotometer (λ_{ex} 530nm and λ_{em} 590nm).

2.6 Qualitative observations by Confocal Imaging and Scanning Electron Microscopy

After the last metabolic assay on day 7, all the samples were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in paraformaldehyde (4% w/v) overnight. Surfaces where cells were seeded were covered by permeabilization mix (BSA 2% (w/v), Triton 0.1% v/v) for 2h at 37°C. A staining mix composed of DAPI (0.1% v/v) and Alexa546-conjugated phalloidin (0.5% v/v) in permeabilization mix, was then applied for 2h at 37°C. All samples were rinsed multiple times in PBS solution before confocal microscopy acquisition (Leica TCS SPE). ImageJ [25] and Imaris (Oxford Instruments plc.) softwares were used to perform the qualitative analysis of the acquisitions.

Samples were dried in consecutive ethanol baths (30%, 50%, 70%, 90% and 99%) with 1h soaking steps, and coated with gold with a sputter coater (EMSCOPE SC500, Elexience, France) before SEM (TM4000+ Hitachi, Japan) observations.

2.7 Cytoskeleton orientation assays

For quantitative analysis of cytoskeleton rearrangement, the Fiji plugin Directionality tool (freely available on GitHub <https://github.com/fiji/Directionality>) was used. Firstly, hyperstacks of height-through acquisitions were performed. Sample matrix opacity-mediated autofluorescence was found to be equal in all conditions observed.

All pictures were manually aligned according to the laser-carved patterns, so the trenches would be parallel (0° and 180°) and perpendicular (90°) to the Fast Fourier Transform (FFT) plan.

As SCAPs physiologically self organize in spindle-shape with narrowing space between cells as the population grows, an increase in signal was expected to be reached at a certain angle. Control samples were then oriented in respect to this physiological feature, at 0° and 180° with respect to the FFT plan. To refine the orientation results, 180 steps of FFT were performed from -45° to 134°.

All results were then gathered and analyzed through GraphPad Prism version 8.0.0 software (GraphPad Software, San Diego, California USA) to generate the FFT heatmaps. Circular histograms frequency plots (with frequency proportionnal to the area of each bar) were obtained through the adaptation of an opensource code from matplotlib.org (version used for this article available upon request and free of use).

2.11 Statistical Analysis

All tests were performed using GraphPad Prism version 8.0.0 software (GraphPad Software, San Diego, California USA). Non-parametric tests were selected when normality test failed, or when the sample size was insufficient. H0 hypothesis was rejected when p-value < 0.05.

3. Results

3.1 Laser-machining of porcine cortical bone

Several profiles of the patterned bone samples were acquired by confocal microscope (Smartproof 5 KMAT, Zeiss, Germany). Representative profiles for each hatch distance are shown in Figure 2.

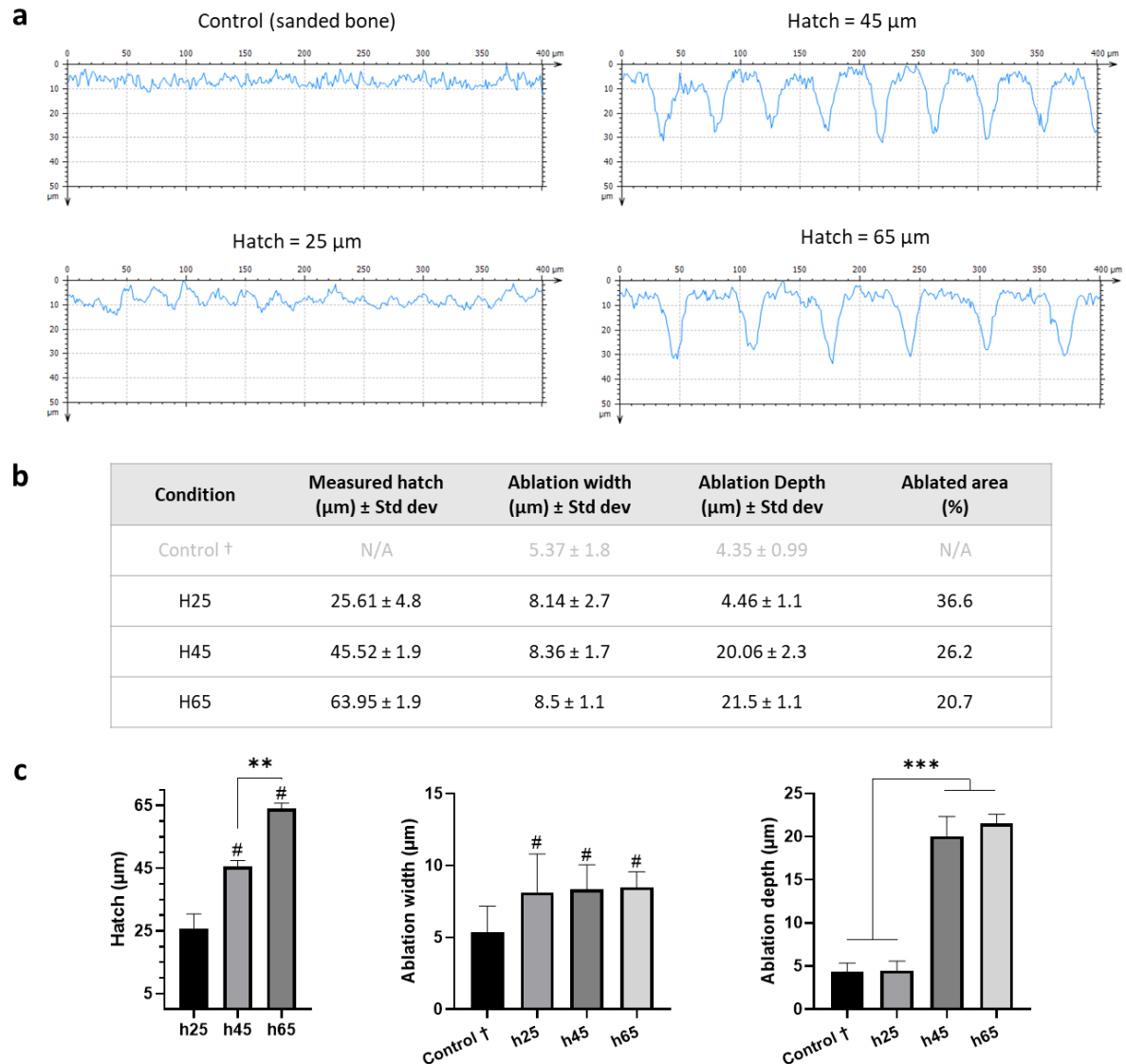


Figure 2 – Profilometric analysis of control (sanded bone) and laser-patterned samples. Examples of each condition surface morphology (a) acquired with Confomap ST 8.2 software. Descriptive statistics (b) and statistical tests (c) of patterning physical parameters (Kruskal-Wallis, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # = *** compared to leftmost bar. $N=3$, $n \geq 12$). †: controls were not patterned with laser. Numbers are displayed as intrinsic sample surface morphology

Descriptive statistics of all obtained measurements were also reported in Figure 2. For the profiles obtained on samples treated with hatch distance of 25 μm, microroughness was adjusted by applying a band-pass filtering with cut-off wavelength of 5 μm in order to have more reliable data. It is important to underline that control samples (sanded bones) were used as reference, and values are displayed to depict the intrinsic surface morphology post-sanding. Measured hatch were respectful to the experimental procedure with high reproducibility. Ablation width

was found to be constant regardless of the hatch employed. However, ablation depth result highlighted that a 25 μ m hatching was ablating a large area of bone. As a result, the surface morphology became similar to control. With the increase of the hatch, ablation depth was found to generate around 21 μ m deep pattern through cortical bone.

3.2 Laser machining impact over recolonizing cells survival

A metabolic, AlamarBlue™ assay based on resorufin fluorescence was performed on all treated and control samples.

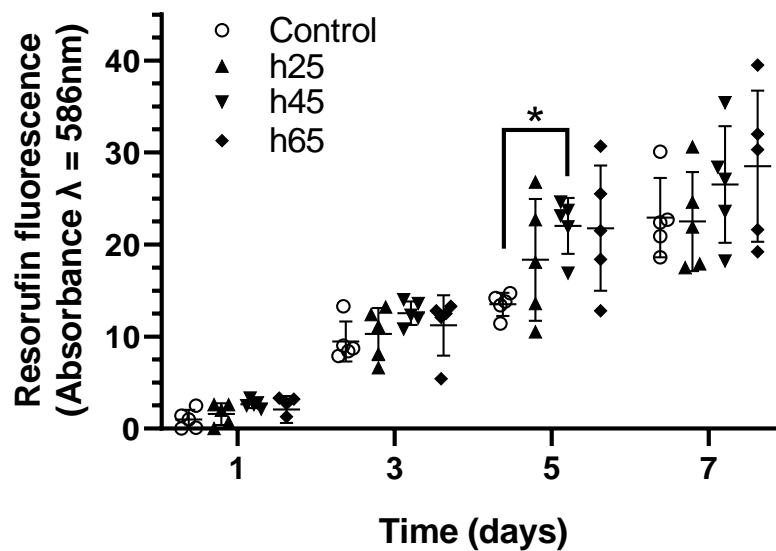


Figure 3 – Metabolic activity of SCAPs seeded over different laser-treated samples. 2000 cells.mm⁻² were seeded at day 0, and measurements were performed on days 1, 3, 5 and 7. Normalized resorufin measured absorbance shows cell viability and growth indirectly via NADH dehydrogenase activity through time. n=5, Kruskal-Wallis test *: p<0.05

The levels of resazurin reduction in SCAPs cultured over laser patterned bones, regardless of the patterns geometry, were similar to the behaviour of SCAPs cultured on control samples (Figure 3). Through time, SCAPs increased their metabolic activity. In all experiment led, absorbances from 25 μ m hatch distance were observed to be close to control, while a tendency of higher absorbances was noticed from 45 μ m and 65 μ m hatch distances. At day 5, fluorescence signal from samples patterned with 45 μ m hatch distance was found to be significantly higher than control. Altogether, these results suggest that laser patterning of bone tissue as cell deposition pre-treatment is cytocompatible and suitable for SCAPs metabolism.

3.3 Laser machining impact over cell orientation

Confocal microscopy imaging of cells after 7 days of culture (Figure 4) gave a first qualitative information on cell morphology with respect to the specific laser-generated patterns.

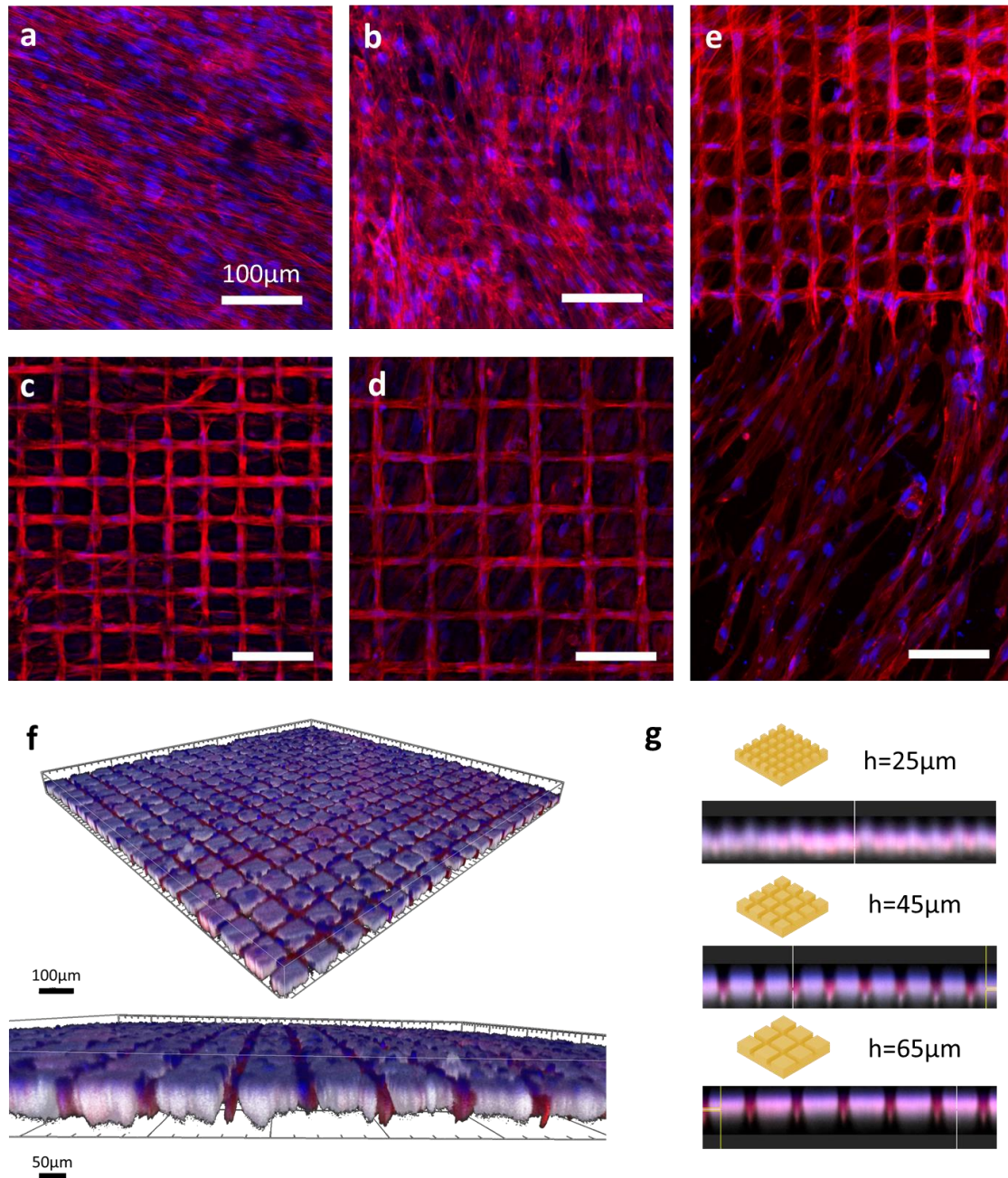


Figure 4: Confocal Microscopy imaging of SCAPs seeded over laser-patterned bones. F-actin (red) and nucleus (blue) structures were respectively stained by Alexa 546-Phalloidin and DAPI. Images were captured on confocal Leica TCS SPE microscope and assembled on ImageJ software. Images represent control sample (a), and samples patterned with hatch distances of 25µm (b), 45µm (c) and 65µm (d). The right-sided panel (e) shows the edge zone between the laser-patterned area and untreated bone. Unspecified scale bars = 100 µm. Lower panels depict 3D reconstruction of confocal z stacks acquisitions with illustration of sample with hatch distance of 65µm (f) and mean orthogonal views (g) of samples with 25, 45 and 65µm hatch distances.

Cells seeded over control samples (Figure 4a) had a very stretched, spindle shape. On samples patterned with a 25µm hatch distance (Figure 4b), cells showed a less self-organised arrangement yet started to visually respect a grid-like pattern, especially with the aligned aspect of nuclei distribution. However, a remarkable difference was observable (Figure 4e) from cells seeded over samples patterned with larger hatch distance; indeed, for samples with 45 and 65µm hatch distance (respectively Figure 4c and 4d), cells were mostly contained within the ablated pattern, even though actin filaments and some nuclei could be observed on area associated to untreated areas. 3D reconstructions (Figure 4f) allowed to observe cell behaviour with a deeper insight, and highlighted the

autofluorescence of bone imaged with UV wavelengths, merging with nuclei signals. Looking at sideviews of 3D reconstructions (Figure 4g), higher intensities of actin staining were found within the cavities created by laser ablation, except for samples patterned with 25 μ m, where the signal was diffused. These observations were consistent with those made with the 2D stacks.

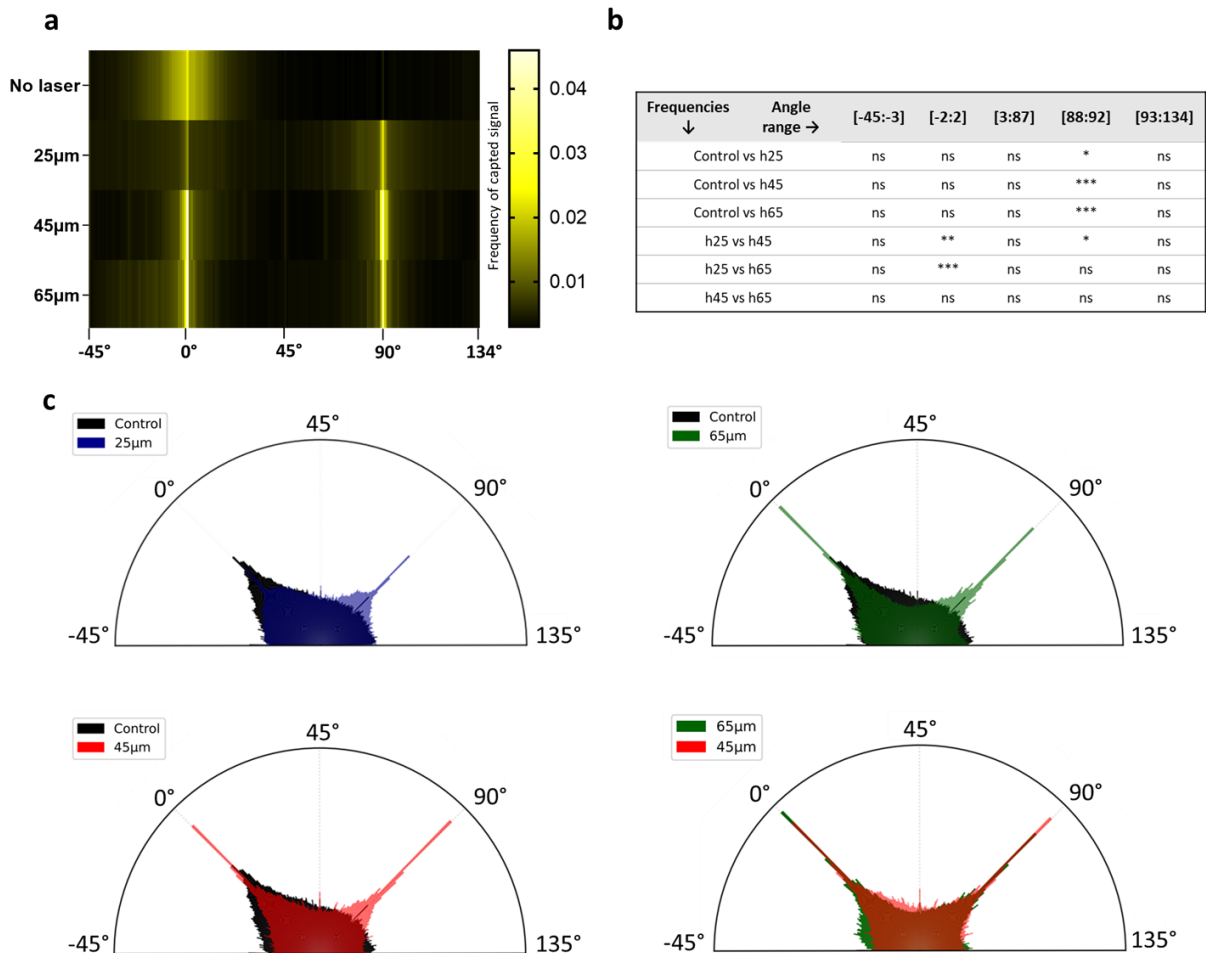


Figure 5: Cell alignment after seeding over laser-patterned samples. Fast Fourier Transform heat map (above) highlights the influence of laser patterning on cell cytoskeletal arrangement, with higher frequencies of aligned cells at 0 and 90°, consistent with the pattern's orientations. Statistical tests were performed over means of angle ranges, with 5° range centered at 0° and 90°, and rest of angles gathering 95% of lowest values (Kruskal-Wallis, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns = not significant, $n = 5$). Cumulated frequency plots (below) (proportional to area of each bar) reveal that frequencies associated with 45 and 65 μ m samples presented overall lower dispersion, and higher frequencies at 0 and 90° angles. Control sample was displayed with an opacity of 100% while all other conditions had a 50% opacity to be stackable.

Actin filaments orientation analyses were performed by FFT analyse of corresponding channel acquired by confocal microscopy. The retrieved data were analyzed and translated graphically with a heat map (Figure 5a) and frequency plots. On the heat maps, frequencies are proportionnal to the intensity of signal retrieved for each angle. A high frequency hence means a lot of signal from actin filaments. The more cells aligned with a given angle, the strongest the signal, and the higher the frequency obtained. Heat maps showed that, in absence of laser patterning, cells are preferentially oriented in a single range of angles with a single area of rise in frequencies. The laser patterning, being vertical and horizontal, induced two peaks of frequencies, regardless of the hatch size. However, significant differences were observed (Figure 5b) in frequencies between 25 μ m and the other hatch sizes around 0°. Around 90°, h25 vs h45 mean frequencies were found to be significantly different, and frequencies from all test conditions were significantly different from control.

The frequency plots (Figure 5c) were generated based on the same data. The areas of each bar are proportionnal to the intensity of signal for each angle. While the heat map highlighted the effect of the patterns on dictating cell adhesion to a defined area, the frequency plots mainly outlined that increasing the hatch distance of the laser-

generated pattern resulted in a decrease of the frequencies. Frequencies detected outside the 0° and 90° angles could be assimilated to cells that did not align to the laser-generated pattern: controls and 25µm patterned samples were associated to homogeneous dispersion and highest frequencies off 0 and 90° angles. By increasing hatch (45 and 65µm), frequencies lowered in out-of-interest ranges. Yet, these observations were not found to be significant.

Altogether, these results were highly consistent with qualitative results aforementioned: cells are mostly aligned with laser-generated patterns, especially regarding superior hatch distances of 45 and 65µm.

3.4 Laser patterning impact over cell adhesion

After confocal imaging, samples were observed with SEM (Figure 6).

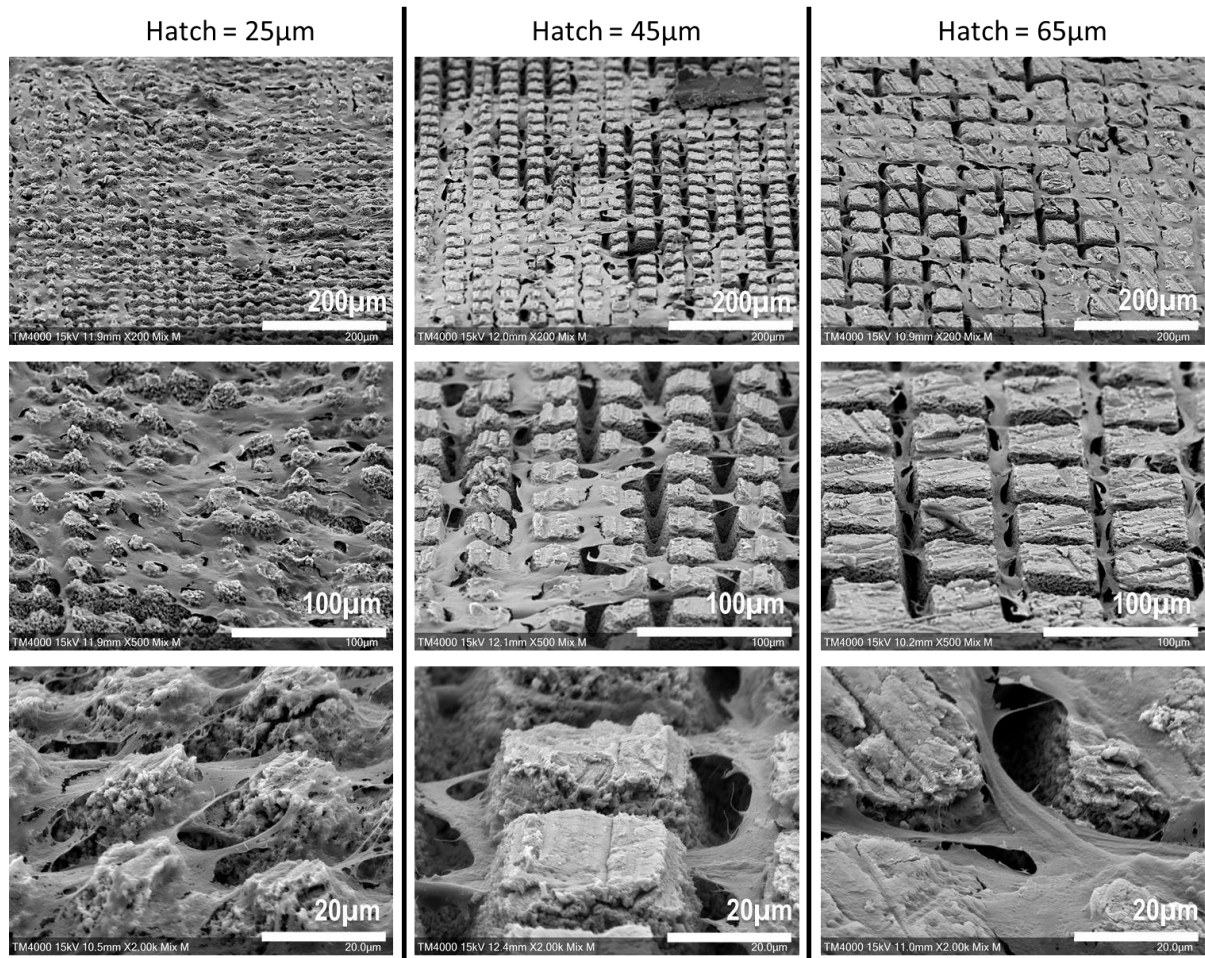


Figure 6: Scanning Electron Microscopy imaging of SCAPs seeded over laser-machined bones. With higher magnifications, cells appear to adhere to the upper side of machined patterns and not at the bottom of it, where laser hit the most bone surface.

This qualitative assessment of cells behavior upon machined area revealed that cells seemed to mostly adhere to the upper side of machined patterns while the remaining space at the bottom of the carved patterns was left unoccupied. However, cells did not prefer adhering to the untreated surface and fitted to the carved patterns, consistently with the confocal microscopy acquisitions.

4. Discussion

The results presented in this work on laser processing of bone tissue demonstrated once again the unique ability of fs laser sources to obtain highly resolutive laser-matter interaction to laser-functionalise a biological tissue by precisely tailoring the patterning geometry.

The machining parameters were dictated by two main aspects : designing a fast and reproducible process, and creating a microtextured surface having an impact on the behavior of osteogenic-related cells.

Hatch sizes were chosen with consideration to physiological cell characteristics and behavior. Average circulating MSC cell sizes being comprised between 15 and 30 μm [26], thus influence of hatch over cell seeding was investigated. A hatch of 25 μm generating surface roughly similar to non-patterned bone, cell settlement was not expected to be much influenced, besides the direct effect of laser-induced matter removal. Hatch sizes of 45 μm and 65 μm were associated to the creation of deeper patterns through the cortical bone (about 20 μm deep). It was hypothesized that cells would preferentially occupy spaces offering three dimensionnal anchoring possibilities. The diminution of carved area proportion within pattern area was expected either to force cells to maximally fill the carved trenches, or to create a cell layer above the pattern and secrete extracellular matrix to overcome the gaps between non-carved areas.

In the experiment led, a depth limit ablation was found to be around 20 μm regardless of the hatch size, a quite common effect in fs laser ablation and could be linked to partial absorption or shielding of the incoming laser pulse from the laser generated plasma [27]. This depth limit allowed to maintain the difference between 45 and 65 μm conditions solely due to the hatch distance discrimination. As seen with the profilometry assay, the ablated area had a conic form, tightening with increased ablation depth. The SEM observations of upperly-adherent cells within the pattern seems consistent with a narrowing available space at the bottom of the pattern, unreachable for large organites such as nucleus[28], which might force cells to remain be closer to the surface of the pattern.

Among the difficulties encountered, bone autofluorescence brought difficulty to properly image samples. Autofluorescence was corrected with the same tresholding for all samples to avoid any inter-acquisition bias. Post-acquisition additionnal tresholding to remove residual background noise was associated with partial loss of cell related information. Therefore, images were kept raw and treated under the same procedure for the Fast Fourier Transform. Still facing the difficulty to evaluate the cell viability through time, a metabolic assay was performed to compare cell activity, and give an indirect sight of cell proliferation through the different texturations evaluated.

SCAPs, a mesenchymal cell population comparable to bone-marrow derived MSCs [29,30], were used in this study as these progenitors are more likely to be recruited *in situ* rather than mature osteoblasts, and more representative of the diversity of osteoblastic cell populations. The impact of vascular-related cells such as endothelial cells should also be investigated in future work.

Laser ablation impact on bone tissue local gene expression profile was previously reported [31,32] and found to enhance osteogenesis compared to trepan ablation. However, in this case, all bones were sanded prior to laser texturation application to free the mineral matrix from organic ECM and periost. In future work, an increased interest should be brought to transcriptomics consequences of laser patterning.

Although many assays exist to quantify cell adhesion [33], the limitations of working with a thick and opaque material with such scale of texturation constituted an obstacle for all known standard techniques. As the stated ambition is the improvement of bone-material interface strength and quality, further work should be conducted *in vivo*, inspired by the quantitative assessment of osteointegration of Hallgren *et al.* [12] and performing histological investigations to investigate the physiological response of laser texturation.

The difficulty to adjust laser technology from benchside to operating room is likely the largest hurdle to see its medical application, considering the high cost of a laser compared to other technologies such as drills or ultrasonication [34,35]. However, this technology is employed with an unprecedented resolution. Moreover, laser patterning could be coupled with laser-assisted bioprinting technology [36], combining the possibility to reshape bone and then precisely project elements of interests (drugs, antibiotics, cells, growth factors...) directly *in situ*, with the same workstation and a unique laser source.

Some work was conducted using deep learning to optimize the development of laser machining, predicting the outcome of skeletal stem cells arrangement according to the laser-machined pattern [37]. The rise of AI-based technologies could significantly improve future research, especially in finding optimum parameters regarding patterning design and biological consequences. Future *in vivo* investigations should be performed with patterns designed to drive cellular colonization with facilitated settlement of, for example, vascular network.

5. Conclusion

For the first time, laser technology was applied directly to texture cortical bone in a perspective of developing new bone-graft materials interface insights for bone tissue engineering. Results showed the high technological potential of femtosecond laser-based processing in tailoring laser-generated bone patterning, and its great cytocompatibility with mesenchymal-derived stromal cells. The different patterns investigated unveiled the possibility to dictate cell orientation. Laser patterning was demonstrated to constitute a great opportunity to develop new aspect of host tissue and graft material interface, and direct patterning of host tissue could be considered in future application of medical devices to enhance grafts.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest related to this work.

References

- [1] Barfeie A, Wilson J and Rees J 2015 Implant surface characteristics and their effect on osseointegration *Br Dent J* **218** E9
- [2] Kang C-W and Fang F-Z 2018 State of the art of bioimplants manufacturing: part II *Adv. Manuf.* **6** 137–54
- [3] West-Livingston L N, Park J, Lee S J, Atala A and Yoo J J 2020 The Role of the Microenvironment in Controlling the Fate of Bioprinted Stem Cells *Chem. Rev.* **120** 11056–92
- [4] Baino F, Montealegre M A, Minguella-Canela J and Vitale-Brovarone C 2019 Laser Surface Texturing of Alumina/Zirconia Composite Ceramics for Potential Use in Hip Joint Prosthesis *Coatings* **9** 369
- [5] Daskalova A, Lasgorceix M, Bliznakova I, Angelova L, Hocquet S, Leriche A, Trifonov A and Buchvarov I 2020 Ultra-fast laser surface texturing of β -tricalcium phosphate (β -TCP) ceramics for bone-tissue engineering applications *J. Phys.: Conf. Ser.* **1492** 012059
- [6] Lasgorceix M, Ott C, Boilet L, Hocquet S, Leriche A, Asadian M, De Geyter N, Declercq H, Lardot V and Cambier F 2019 Micropatterning of beta tricalcium phosphate bioceramic surfaces, by femtosecond laser, for bone marrow stem cells behavior assessment *Materials Science and Engineering: C* **95** 371–80
- [7] Olsson R, Powell J, Palmquist A, Brånemark R, Frostevarg J and Kaplan A F H 2018 Production of osseointegrating (bone bonding) surfaces on titanium screws by laser melt disruption *Journal of Laser Applications* **30** 042009
- [8] Man H C, Chiu K Y and Guo X 2010 Laser surface micro-drilling and texturing of metals for improvement of adhesion joint strength *Applied Surface Science* **256** 3166–9
- [9] Coathup M J, Blunn G W, Mirhosseini N, Erskine K, Liu Z, Garrod D R and Li L 2017 Controlled laser texturing of titanium results in reliable osteointegration *J Orthop Res* **35** 820–8
- [10] Ulerich J P, Ionescu L C, Chen J, Soboyejo W O and Arnold C B 2007 Modifications of Ti-6Al-4V surfaces by direct-write laser machining of linear grooves *Photon Processing in Microelectronics and Photonics VI* Photon Processing in Microelectronics and Photonics VI vol 6458 (SPIE) pp 307–16
- [11] Nuutinen T, Silvennoinen M, Päiväsaari K and Vahimaa P 2013 Control of cultured human cells with femtosecond laser ablated patterns on steel and plastic surfaces *Biomed Microdevices* **15** 279–88

- [12] Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J and Wennerberg A 2003 An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining *Biomaterials* **24** 701–10
- [13] Carvalho A, Grenho L, Fernandes M H, Daskalova A, Trifonov A, Buchvarov I and Monteiro F J 2020 Femtosecond laser microstructuring of alumina toughened zirconia for surface functionalization of dental implants *Ceramics International* **46** 1383–9
- [14] Gnilitzkiy I, Pogorielov M, Viter R, Ferraria A M, Carapeto A P, Oleshko O, Orazi L and Mishchenko O 2019 Cell and tissue response to nanotextured Ti6Al4V and Zr implants using high-speed femtosecond laser-induced periodic surface structures *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **21** 102036
- [15] Lee B E J, Exir H, Weck A and Grandfield K 2018 Characterization and evaluation of femtosecond laser-induced sub-micron periodic structures generated on titanium to improve osseointegration of implants *Applied Surface Science* **441** 1034–42
- [16] Gemini L, Al-Bourgol S, Machinet G, Bakkali A, Faucon M and Kling R 2021 Ablation of Bone Tissue by Femtosecond Laser: A Path to High-Resolution Bone Surgery *Materials* **14** 2429
- [17] Plötz C, Schelle F, Bourauel C, Frentzen M and Meister J 2015 Ablation of porcine bone tissue with an ultrashort pulsed laser (USPL) system *Lasers Med Sci* **30** 977–83
- [18] Canguero L T, Vilar R M C da S, Rego A M B do and Muralha V S F 2012 Femtosecond laser ablation of bovine cortical bone *JBO* **17** 125005
- [19] Girard B, Yu D, Armstrong M r., Wilson B c., Clokie C m. I. and Miller R J D 2007 Effects of femtosecond laser irradiation on osseous tissues *Lasers in Surgery and Medicine* **39** 273–85
- [20] Um S-H, Lee J, Song I-S, Ok M-R, Kim Y-C, Han H-S, Rhee S-H and Jeon H 2021 Regulation of cell locomotion by nanosecond-laser-induced hydroxyapatite patterning *Bioactive Materials* **6** 3608–19
- [21] Rémy M, Ferraro F, Le Salver P, Rey S, Genot E, Djavaheri-Mergny M, Thébaud N, Boiziau C and Boeuf H 2019 Isolation and Culture of Human Stem Cells from Apical Papilla under Low Oxygen Concentration Highlight Original Properties *Cells* **8** E1485
- [22] Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan R S, Wang S, Shi S and Huang G T-J 2008 Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study *J Endod* **34** 166–71
- [23] Touya N, Devun M, Handschin C, Casenave S, Ahmed Omar N, Gaubert A, Dusserre N, De Oliveira H, Kérouredan O and Devillard R 2022 In vitro and in vivo characterization of a novel tricalcium silicate-based ink for bone regeneration using laser-assisted bioprinting *Biofabrication* **14**
- [24] Rampersad S N 2012 Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays *Sensors (Basel)* **12** 12347–60
- [25] Schneider C A, Rasband W S and Eliceiri K W 2012 NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis *Nat Methods* **9** 671–5
- [26] Khan R S and Newsome P N 2019 A Comparison of Phenotypic and Functional Properties of Mesenchymal Stromal Cells and Multipotent Adult Progenitor Cells *Frontiers in Immunology* **10**
- [27] Zhang H, van Oosten D, Krol D M and Dijkhuis J I 2011 Saturation effects in femtosecond laser ablation of silicon-on-insulator *Appl. Phys. Lett.* **99** 231108

- [28] Webster M, Witkin K L and Cohen-Fix O 2009 Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly *J Cell Sci* **122** 1477–86
- [29] Shi S, Robey P G and Gronthos S 2001 Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis *Bone* **29** 532–9
- [30] Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R and Ueda M 2006 Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy *Biomaterials* **27** 3766–81
- [31] Shimohira T, Katagiri S, Ohsugi Y, Hirota T, Hatasa M, Mizutani K, Watanabe K, Niimi H, Iwata T and Aoki A 2021 Comprehensive and Sequential Gene Expression Analysis of Bone Healing Process Following Er:YAG Laser Ablation *Photobiomodul Photomed Laser Surg* **39** 100–12
- [32] Ohsugi Y, Aoki A, Mizutani K, Katagiri S, Komaki M, Noda M, Takagi T, Kakizaki S, Meinzer W and Izumi Y 2019 Evaluation of bone healing following Er:YAG laser ablation in rat calvaria compared with bur drilling *Journal of Biophotonics* **12** e201800245
- [33] Khalili A A and Ahmad M R 2015 A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications *Int J Mol Sci* **16** 18149–84
- [34] Troedhan A, Mahmoud Z T, Wainwright M, Khamis M M, Troedhan A, Mahmoud Z T, Wainwright M and Khamis M M 2017 Cutting bone with drills, burs, lasers and piezotomes: A comprehensive systematic review and recommendations for the clinician *International Journal of Oral and Craniofacial Science* **3** 020–33
- [35] Du L, Zhai K, Li X, Liu S and Tao Y 2020 Ultrasonic vibration used for improving interfacial adhesion strength between metal substrate and high-aspect-ratio thick SU-8 photoresist mould *Ultrasonics* **103** 106100
- [36] Kérourédan O, Rémy M, Oliveira H, Guillemot F and Devillard R 2018 Laser-Assisted Bioprinting of Cells for Tissue Engineering *Laser Printing of Functional Materials* (John Wiley & Sons, Ltd) pp 349–73
- [37] Mackay B S, Praeger M, Grant-Jacob J A, Kanczler J, Eason R W, Oreffo R O C and Mills B 2020 Modeling adult skeletal stem cell response to laser-machined topographies through deep learning *Tissue and Cell* **67** 101442

4.3.3 Conclusion

Pour la première fois, un modèle de texturation osseuse par laser est proposé pour l'exploration d'applications d'ingénierie tissulaire.

L'application de différents motifs de texturation a été évaluée ici et a permis de démontrer la faisabilité d'utiliser une source laser femtoseconde pour parvenir à ce but. La cytocompatibilité des paramètres d'usinages établis a été validée sur un modèle cellulaire mésenchymateux. Les différents motifs de texturation employés ont permis de démontrer une réponse de colonisation cellulaire différente, traduite par une orientation de l'adhésion cellulaire en fonction du motif appliqué. De futurs travaux seront menés pour établir de façon quantitative, *in vitro* et *in vivo*, l'impact de cette texturation sur l'adhésion cellulaire et la reconstruction matricielle à la zone d'interface.

Ce projet de texturation osseuse par ablation partielle au laser renforce le potentiel de versatilité d'une station de découpe et d'impression pensée pour l'ingénierie tissulaire. Avec une même source laser, il serait donc possible, de façon rapide et sans matériel supplémentaire, de bénéficier des propriétés d'usinage, texturation et de bio-impression.

Chapitre 5

Discussion

5.1 Choix des modèles utilisés

5.1.1 Le modèle cellulaire

Dans ces travaux de thèse, les SCAPs ont été privilégiées plutôt que des MSCs dérivées de moelle osseuse afin d'évaluer la régénération osseuse médiée par des cellules compétentes d'un point de vue ostéogénique. Les hBMMSCs constituent la population standard d'étude pour la régénération osseuse. Elles bénéficient d'une littérature plus fournie, et permettent plus aisément de faire l'objet d'un consensus au regard des résultats obtenus dans les études menées avec ce modèle plutôt qu'un autre. Comme motivé en introduction, le choix des SCAPs a été fait en raison de leur disponibilité et de leur multipotence, avec notamment une excellente capacité ostéogénique *in vitro*. Devant le nombre d'interventions de médecine bucco-dentaire, l'optimisation des produits de l'ingénierie tissulaire maxillo-faciale désigne également les SCAPs comme population d'intérêt majeur [309]. Cependant, les SCAPs ne se limitent pas à leur potentiel ostéogénique ou d'interaction avec les autres tissus maxillo-faciaux : elles servent de modèle dans des études portant sur l'ingénierie tissulaire vasculaire [310], la régénération tissulaire nerveuse [311–313] ou encore l'immunomodulation [314].

Les travaux menés ici avaient pour modèle *in vivo* des souris NSG, dans lesquelles du matériel cellulaire humain a été transféré. Au regard de l'absence de lymphocytes B, T et de natural killer cells, ainsi que l'ensemble des profils cytokiniques pouvant être associés à ces lignées cellulaires, l'immunodéficiência de ces animaux soulève des questions sur la qualité des réponses de régénération osseuse observées, et sur la pertinence de ce modèle d'un point de vue physiologique. Cependant, ce modèle animal présente l'avantage de pouvoir discriminer les cellules de l'hôte des cellules xénogéniques imprimées, et l'utilisation des

contrôles adéquats permet la limitation de certains biais, avec pour principale préoccupation la différence de réponse entre l'ensemble des contrôles et l'ensemble des conditions expérimentales.

5.1.2 Le modèle de défaut critique osseux dans une calvaria murine

Le potentiel régénératif et les dynamiques de régénération sont différentes selon les os ciblés [315], les espèces étudiées [316], et le choix de la taille du défaut. De plus, notre modèle *in vivo* étant la souris immunodéficiente, la réponse osseuse à la création d'un défaut est également un élément à considérer en l'absence d'une capacité de réponse immunitaire complète. En effet, bien que l'immunité innée ne soit pas un élément déterminant du processus de régénération osseuse, l'immunodéficience des souris NSG a été rapportée comme un facteur délétère pour l'ossification endochondrale [317].

Le modèle pour étudier la réparation osseuse était un défaut de taille critique (\emptyset 3.3mm) dans la calvaria de souris. Ce choix de modèle a été motivé par la possibilité de comparer les résultats obtenus à ceux des travaux précédents initiés par l'équipe, lesquels ont opté pour la création d'un défaut dans la région maxillo-faciale pour plusieurs raisons. Il est possible de créer plusieurs défauts de taille critique sur une même calvaria, et de bénéficier ainsi d'un défaut contrôle et d'un défaut test sur le même animal. La calvaria est un os plat qui a pour principale fonction la protection du cerveau [318], sans fonction de soutien mécanique. La création d'un défaut y est le moins susceptible d'impacter négativement le bien-être post-opératoire de l'animal pour la durée de l'expérimentation. Le défaut circulaire, bien qu'éloigné des types "classiques" de fractures présentées en introduction, permet d'obtenir une lésion dont chaque point des berges est à équidistance du centre du défaut, ce qui permet une observation de la régénération sans biais d'effets de bords. Enfin, la souris étant un petit animal, l'accessibilité et la taille des os crâniens sont avantageux pour la pratique chirurgicale.

5.2 Formulation de l'encre à base de silicium tricalcique

L'encre, dans sa formulation utilisée dans le cadre des travaux de la section 3.3 (0.5g/ml de BioRoot mélangé à une solution de 2mg/ml de collagène dans du DMEM) s'est révélée la plus performante au regard de la qualité des impressions obtenues en termes de fidélité, de répétabilité et de reproductibilité. Cependant, l'effet sur la régénération du défaut

osseux créé est resté limité.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de différence significative avec ce type d'encre. La première concerne le volume utilisé : avec l'utilisation du laser, 50 nanolitres d'encre ont été déposés *in situ*, soit entre 30 et 40 fois moins qu'un dépôt à la pipette (1.7 μ l) pour lequel a été observé une différence significative de minéralisation par rapport au dépôt laser. Cependant, la quantité déposée à la pipette correspondait strictement au volume de calvaria retiré (en se basant sur une calvaria d'une épaisseur moyenne de 200 μ m, avec un volume ablaté selon un diamètre de 3.3mm). Le remplissage du défaut par l'encre matériau n'a pas suffi à générer de minéralisation significative comparativement aux défauts contrôle. Il est possible, en appliquant un volume plus important, d'obtenir un effet/dose plus satisfaisant. Cependant, cette hypothèse implique l'absence d'utilisation de la technologie d'impression laser, ainsi que le dépassement du volume théorique du défaut.

La seconde hypothèse met en cause la formulation de l'encre utilisée *in vivo*. Il est essentiel de souligner l'absence de progéniteurs endothéliaux dans le modèle final de l'association encre-matériau et bioencre. Cette absence est due à une observation de cytotoxicité *in vitro* exercée par l'encre-matériau sur des HUVECs. Cette cytotoxicité pourrait être expliquée par la présence d'oxyde de zirconium (ZrO₂), rapportée comme délétère au contact direct des cellules endothéliales en l'absence d'une couche protectrice de MSCs [319]. Bien que ZrO₂ promeuve la différenciation ostéogénique des MSCs [320] à partir d'une concentration de 50 μ M, la quantité de ZrO₂ de l'encre-matériau a été estimée à 20mM dans nos conditions de culture, soit 400 fois plus. L'ensemble de la littérature [321] et des travaux de Kérourédan *et al.* [238] ayant fait un lien entre architecture vasculaire et régénération osseuse, il serait judicieux d'ajuster la formulation du BioRoot RCS® en diminuant ou retirant le ZrO₂, ou de partir à nouveau d'un matériau pur de silicate tricalcique (mais perdant de ce fait l'avantage d'une formulation bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché).

Dans le même sens, la littérature met en avant, dans la majorité des cas, le caractère synergique de l'ajout de Si avec d'autres éléments, en citant notamment le Zinc (Zn) et le Magnesium (Mg). Ces deux éléments ont été rapportés comme exerçant un contrôle sur l'angiogenèse et la formation osseuse [322, 323]. L'un des axes de recherche prioritaire de la formulation utilisée ici serait d'intégrer un ou plusieurs facteurs conçus pour amplifier ou diriger l'angiogenèse, tels que du Zn et/ou du Mg, avec de potentielles synergies ciblant l'innervation [47]. L'utilisation du laser pourrait permettre d'élucider dans un modèle de

coculture cellules endothéliales-cellules mésenchymateuses *in vitro* certains mécanismes de tropisme cellulaire, ou de mesurer un effet/dose de formulations tests avant d'appliquer *in vivo* une formulation d'encre améliorée.

5.3 Cibles thérapeutiques actuelles et perspectives

L'objectif, pour l'instant inaccessible, que poursuit l'ingénierie tissulaire osseuse est le développement d'un matériau cellularisé résorbable qui pourrait rapidement fusionner avec l'os, et dont les propriétés mécaniques seraient à même de substituer le tissu osseux minéralisé, avec un système vasculaire mature ou une alternative fonctionnelle pour permettre une perfusion quasi-immédiate du tissu. En attendant, les recherches actuelles semblent graviter autour de deux axes : la poursuite de la compréhension du tissu osseux et de ses dynamiques, et le développement et l'expérimentation de substituts complexes.

Il semble que l'effort mené sur l'interface entre tissu natif et implant, zone critique d'interaction, soit à poursuivre. Si la minéralisation de l'implant et son remodelage peut être initiée par l'ensemencement de progéniteurs ostéogéniques au sein du matériau, la colonisation et le développement d'une matrice homéostatique repose sur la capacité du matériau à recruter et intégrer les cellules de l'hôte. A moyen et long termes, c'est la qualité de l'établissement de ce tissu néo-formé qui sera à l'origine de la performance finale de sa fonction. Le concept d'une encre-matériau fonctionnant comme un ciment chargé de cellules pourrait permettre d'améliorer cette interface entre le tissu osseux natif et les substituts actuels, en accélérant le processus d'ostéointégration.

Dans l'optique d'améliorer le processus de minéralisation, le recours à des progéniteurs ostéoblastiques, à des facteurs pro-différenciateurs de la voie ostéogénique, et la fourniture *in situ* de phosphate et de calcium pour la synthèse d'hydroxyapatite sont les trois stratégies les plus courantes actuellement. Dans ces travaux, la stratégie de minéralisation peut se résumer à l'emploi de progéniteurs (SCAPs), mis en présence d'une source de calcium, avec comme adjuvants principaux du Silicium et du collagène. L'ajout de facteurs plus spécifiques de la différenciation et de la maturation ostéoblastiques, tels que TGF- β ou BMP-2 [324], pourrait être envisagé. Cependant, l'ajout de facteurs de croissance a été rapporté comme associé à des effets secondaires indésirables, tels que la formation osseuse ectopique, et fait l'objet d'une vigilance particulière [325].

Récemment, une étude des particules minérales osseuses a dévoilé deux nouvelles particularités organisationnelles [326]. En effet, le calcium phosphate amorphe déshydraté

constituerait la couche externe des particules minérales osseuses, et donc l'interface privilégiée avec les composants organiques plutôt que les cristaux stables d'hydroxyapatite. L'étude souligne que plus de la moitié des ions phosphates inorganiques de l'os seraient ainsi sous une forme phosphate-monohydrogène, sur la face externe des particules minérales osseuses. Cette spécificité remet en cause le modèle d'organisation des cristaux stables d'hydroxyapatite, et met en perspective de nouvelles formes d'interactions possibles avec des composants organiques [327]. Ce résultat fait notamment écho avec la mise en évidence chez zebrafish, modèle animal de pathologies génétiques osseuses, d'un rôle prépondérant du phosphate de calcium amorphe dans la formation osseuse [328]. une compréhension approfondie des réactions de minéralisation *in vivo* pourrait permettre d'identifier de nouveaux leviers de performance pour l'ostéointégration des matériaux.

Abordé dans la section précédente, l'un des enjeux majeur pour l'ostéointégration et l'ostéoconduction est le développement d'un système vasculaire performant. Le ciblage de la vascularisation des tissus et des substituts osseux apparaît dès lors comme nécessaire. Les stratégies d'apport de progéniteurs endothéliaux, d'ajout de facteurs de croissance ou de recrutement associés à la vascularisation, ou d'optimisation de la surface des matériaux cibles pour favoriser l'ancrage et la prolifération des cellules endothéliales, sont autant de pistes de recherches potentielles à poursuivre.

5.4 La technologie de Bio-impression Assistée par Laser

Une revue récente de la littérature par Antoshin et *al.*, audacieusement intitulée "LIFT-bioprinting, is it worth it?" (La bio-impression par laser vaut-elle le coup ?) [202] vient questionner la pertinence de l'utilisation du laser comme outil de bio-impression. Cette revue systématique de la littérature s'est appuyée sur un algorithme afin de recenser l'ensemble des publications impliquant l'utilisation de la technologie laser au service d'un process ayant pour but l'impression d'éléments cellulaires. Ainsi, sur 107 articles initialement récupérés, 33 articles ont été retenus pour la poursuite de la revue. Brièvement, la revue met l'accent sur quatre points critiques associés à l'utilisation du LIFT et de ses dérivés :

1. La couche d'absorption d'énergie est source d'interrogation. Antoshin et *al.* mettent en évidence qu'aucune étude n'a cherché à quantifier le volume de matière de cette couche de métal transféré lors de chaque impact du laser. Il est donc impossible de déterminer l'impact de ces résidus potentiels. L'EAL (pour *Energy Absorbing Layer*)

étant une couche généralement fine ($<100\text{nm}$), la quantité de matière transférée est présumée négligeable, d'autant plus que le jet de matériel projeté est supposé être éloigné du plasma d'EAL.

Prenons un cas pratique tel qu'expérimenté au laboratoire : l'impact d'un laser sur une EAL de 100nm d'or pour projeter une encre de couche d'une épaisseur de $50\mu\text{m}$, en ablatant une surface de $100\mu\text{m}$ de diamètre. Le volume approximé d'or, en admettant que l'intégralité du volume de l'EAL se retrouve au sein d'une goutte générée de 400 picolitres, serait de $0,8$ femtolitres. Le ratio EAL:encre serait donc de $1:500$ au maximum, et ce avant d'être dilué au moment du transfert au substrat receveur. Les études ayant mis en évidence un effet délétère du process d'impression sur la viabilité cellulaire, ou des dégâts sur l'ADN, discriminent leur source laser utilisée, plus énergétique (UV), comme facteur responsable. En outre, la littérature récente autour du sujet peine à identifier un consensus [329] mais il semblerait que, dans le cas du LIFT pour la régénération osseuse, cette quantité d'or transférée soit non-cytotoxique sur les cellules ostéogéniques [330].

Ce point critique permet de souligner une nouvelle fois l'hétérogénéité des sources lasers employées en bio-impression, avec les contraintes et spécificités associées au choix de la longueur d'onde. Cependant, Antoshin *et al.* mettent en avant qu'environ la moitié des études abordées utilisent une source laser de longueur d'onde 1064 nm , avec des durées de pulse de l'ordre de la nanoseconde, et que l'utilisation de l'or comme EAL semble faire consensus (Figure 43).

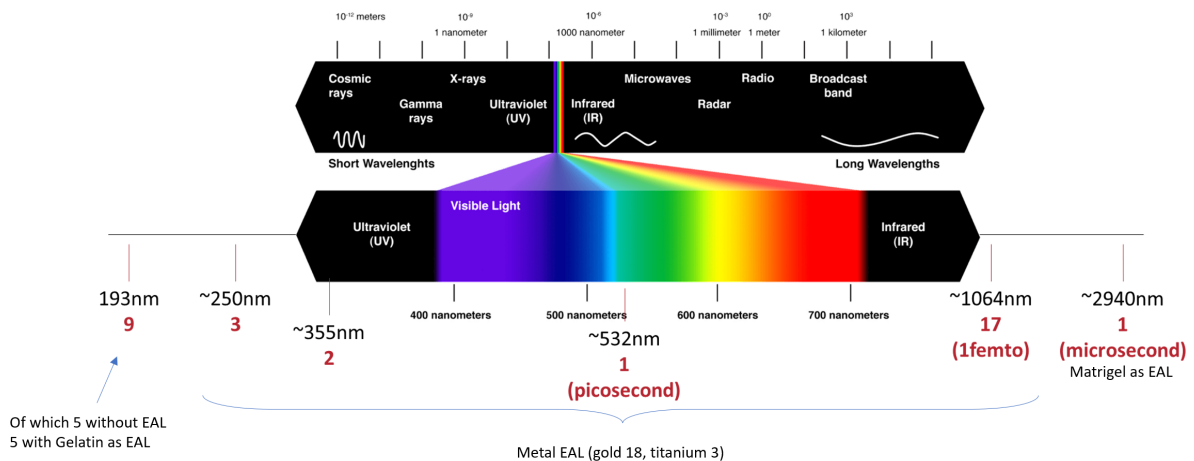


Figure 43: Ensemble des sources lasers et EAL associées dans la revue de Antoshin *et al.*

2. Les phénomènes de mort cellulaire imputables au procédé d'impression. Selon le dispositif matériel utilisé (énergie du laser, épaisseur du substrat receveur) la

profondeur de pénétration des cellules peut varier et entraîner des phénomènes de mort cellulaire. Ceci peut s'expliquer soit par la projection trop brutale des cellules au travers de matière qui pourrait physiquement les endommager, soit par le dépôt de cellules à une profondeur telle que les cellules imprimées n'ont plus accès à l'oxygène ou aux nutriments essentiels et ne peuvent évacuer leurs métabolites cytotoxiques.

3. Les dynamiques de formation du jet manquent de reproductibilité. La formation du jet, à l'origine de la qualité finale de l'impression, est dépendante d'une pluralité de facteurs qu'il est difficile de maîtriser, telle que la répartition des cellules au sein de l'encre, considérée dès lors comme une suspension colloïdale davantage qu'un fluide.
4. L'instabilité de l'encre. La qualité de l'impression est étroitement corrélée à la stabilité de l'encre. Au vu de la finesse des couches utilisées en LAB, la fenêtre d'imprimabilité n'est atteinte que durant un intervalle de temps court, car l'encre commence à sécher au bout de quelques dizaines de secondes. De même, le transfert de matière peut affecter l'encre résiduelle du support donneur, et la formation du jet à l'impact suivant du laser, si celui-ci est produit dans des intervalles d'espace et de temps trop rapprochés.

Ces critiques sont spécifiques de l'utilisation du laser, et constituent les enjeux du développement des plateformes d'impression laser de prochaine génération: maîtrise d'un transfert de matière plus reproductible par une maîtrise de la manipulation de l'encre, optimisation du dispositif pour limiter les coûts de synthèse de quantités d'encre nécessaires aux processus d'impression laser, amélioration des outils de CAO...

De même, malgré l'existence d'une large bibliographie sur les phénomènes de cavitation et de formation de jet, certains mécanismes physiques impliqués dans le processus de transfert de matière assisté par laser restent obscurs. Sans ces connaissances, un manque fondamental de maîtrise sur le procédé demeurera. Des outils de modélisation sont actuellement en cours de développement pour faire le lien entre les modèles mathématiques et les observations expérimentales [213], pour permettre à terme d'optimiser l'utilisation de cette technologie.

Si la tendance actuelle va à l'utilisation de la technologie d'extrusion pour la biofabrication de substituts osseux, l'ingénierie tissulaire est fondamentalement un domaine transdisciplinaire, qui ne se limite pas à des outils mono-technologiques. Le futur de la bio-impression est vraisemblablement voué à l'emploi de multiples stratégies et technolo-

gies, co-dépendantes et complémentaires.

Bien que l'impression *in situ*, *in vivo* ait été pensée et anticipée en science-fiction depuis plusieurs dizaines d'années (par exemple, la machine qui "reconstruit" le 5^e élément dans le film éponyme de Luc Besson sorti en 1997), et commence à voir le jour dans un cadre strict de recherche et développement, la probabilité de voir les outils de bio-impression *in situ* devenir une réalité clinique bien établie est encore faible. Cependant, cette probabilité augmente considérablement au fil des avancées technologiques et expérimentales de la recherche. D'après le site de recensement des essais cliniques <https://clinicaltrials.gov/>, 3 essais cliniques associés au mot-clé "bioprinting" sont en phase de recrutement, et 161 existent (dont 47 déjà complétés) associés au mot-clé "3D printing" (site consulté en octobre 2022). Ces chiffres devraient se développer à l'avenir, renforcés par l'émergence de nouveaux outils d'analyse et de traitement de données tel que le machine learning [331–334].

Si les recherches menées sur et autour de la bio-impression ne permettent pas pour le moment la biofabrication d'organes entiers [145], l'avènement de la production d'organoïdes —versions miniaturisées et simplifiées d'organes— a été permis par l'essor de la bio-impression [335]. Le tissu osseux est complexe à reproduire, mais il est très probable que des modèles physiologiques et exploratoires des maladies génétiques et différents types de fractures affectant l'os verront le jour d'ici quelques années, avec des organoïdes issus de procédés de bio-impression.

Chapitre 6

Conclusion & Perspectives

6.1 Retour sur les travaux menés, axes d'amélioration et pistes pour de futurs travaux

Développement d'une formulation d'encre-matériau à base de silicium tricalcique pour la régénération osseuse

L'ensemble des travaux de cette thèse s'inscrivait dans la continuité des pistes de l'étude de régénération osseuse par impression assistée par laser initiée au début des années 2010 au laboratoire BioTis. Le développement d'une encre minéralisée, disposant d'une transition gel-sol pour réticuler *in situ*, afin de servir de substrat rigide aux cellules hôtes ainsi qu'aux cellules imprimées, a été le premier objectif majeur poursuivi. Bien qu'ayant identifié une formulation satisfaisant le cahier des charges de l'imprimabilité avec la technologie de LAB, et avec l'obtention de résultats *in vitro* encourageants, la réponse osseuse dans un modèle vivant n'était pas à la hauteur d'une régénération *ad integrum* visée.

Au regard des travaux initiés incluant le silicium comme agent pour stimuler la réponse osseuse dans la littérature, et fort de l'expérience menée ici dans le développement infructueux *in vivo* d'une encre à base de silicium tricalcique, la formulation de l'encre doit être substantiellement améliorée.

Applications transversales du laser au service de l'ingénierie du tissu osseux

Aucune autre technologie n'est pour le moment, à notre connaissance, suffisamment évoluée pour offrir les mêmes spécificités à la même résolution que l'utilisation du laser. Les conséquences *in vivo* à l'échelle cellulaire et tissulaire [336] d'une ablation médiée par laser semblent favoriser une réponse ostéogénique comparativement à l'utilisation

d'un trépan en acier [337]. Dans un champ d'application maxillo-facial, il semblerait que, comparativement à l'utilisation de piezotome, l'ablation laser soit moins performante [338]. Cependant, il apparaît que l'utilisation des ultrasons en bio-impression ne soit pour le moment pas suffisamment avancée [339, 340] pour permettre le transfert sans intermédiaire de matériel d'intérêt *in situ*.

6.2 *From bench to bedside ? Contribution à l'ingénierie tissulaire et réflexion autour de l'impression laser*

La perspective d'une utilisation clinique de l'impression laser comme outil d'intérêt principal, bien que plus avancée sur d'autres cibles thérapeutiques que l'os, demeure une vision de moyen à long terme, et ne bénéficie pas de la même notoriété que l'extrusion ou le jet d'encre. La conception de larges structures biologiques complexes uniquement par impression laser reste actuellement irréaliste. Toutefois, le LIFT dispose de qualités essentielles et inédites à la recherche fondamentale. La question soulevée par la revue de Antoshin *et al.* sur la pertinence du LIFT met en exergue deux aspects non traités par les auteurs: 1/ la persistance de lacunes de compréhension fondamentale dans la maîtrise de cet outil et 2/ l'étroitesse du champ d'exploitation de cette technologie à des fins d'ingénierie tissulaire.

Le LIFT appliqué à la biologie demeure aujourd'hui une technologie support de la recherche fondamentale. De rares exceptions [341], telle que la microdissection laser [342], jouissent de matériel et d'applications de transfert par laser à des fins biologiques de grade commercial. Il appartient aux chercheurs de franchir les barrières entre les disciplines pour promouvoir le potentiel du LIFT, dont l'utilisation a par exemple commencé à émerger en microbiologie [343].

Bien qu'à l'horizon 2022 le laser figure au second rang des procédés de bio-impression sur un plan purement quantitatif, les caractéristiques avantageuses de cette technologie sont actuellement inégalables. En outre, ses spécificités permettant de compenser certains défauts intrinsèques aux autres technologies, la synergie qu'offre la combinaison de plusieurs stratégies d'impression place l'impression laser *a minima* comme un procédé complémentaire au service de l'ingénierie tissulaire. Dans le cadre de la régénération osseuse, et au-delà, l'impression assistée par laser est un outil dont le développement et l'utilisation devraient continuer de susciter de l'intérêt dans l'exploration des micro-environnements, et une technologie qui pourrait constituer un atout majeur pour permettre de percer les secrets encore nombreux des mécanismes qui sous-tendent le vivant.

Références Bibliographiques

1. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. eng. Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN **3 Suppl 3**, S131–139. ISSN: 1555-905X (Nov. 2008).
2. Galea, G. L., Zein, M. R., Allen, S. & Francis-West, P. Making and shaping endochondral and intramembranous bones. Developmental Dynamics **250**, 414–449. ISSN: 1058-8388. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7986209/> (2022) (Mar. 2021).
3. Zhu, G. et al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. en. Bioactive Materials **6**, 4110–4140. ISSN: 2452-199X. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X21001547> (2022) (Nov. 2021).
4. Howship, J. Microscopic Observations on the Structure of Bone. en. Medico-Chirurgical Transactions **7**. Publisher: Royal Society of Medicine Press, 382. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2129054/> (2022) (1816).
5. Shah, F. A., Ruscsák, K. & Palmquist, A. 50 years of scanning electron microscopy of bone—a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. en. Bone Research **7**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 1–15. ISSN: 2095-6231. <https://www.nature.com/articles/s41413-019-0053-z> (2022) (May 2019).
6. Guimarães, C. F., Gasperini, L., Marques, A. P. & Reis, R. L. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. en. Nature Reviews Materials **5**. Number: 5 Publisher: Nature Publishing Group, 351–370. ISSN: 2058-8437. <https://www.nature.com/articles/s41578-019-0169-1> (2022) (May 2020).
7. Rho, J. Y., Ashman, R. B. & Turner, C. H. Young’s modulus of trabecular and cortical bone material: Ultrasonic and microtensile measurements. en. Journal of Biomechanics **26**, 111–119. ISSN: 0021-9290. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002192909390042D> (2022) (Feb. 1993).
8. Willems, G., Celis, J. P., Lambrechts, P., Braem, M. & Vanherle, G. Hardness and Young’s modulus determined by nanoindentation technique of filler particles of dental restorative materials compared with human enamel. eng. Journal of Biomedical Materials Research **27**, 747–755. ISSN: 0021-9304 (June 1993).

9. Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C. & Goldberg, H. A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. Biochemical Journal **317**, 59–64. ISSN: 0264-6021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1217486/> (2022) (July 1996).
10. Weiner, S., Traub, W. & Wagner, H. D. Lamellar bone: structure-function relations. eng. Journal of Structural Biology **126**, 241–255. ISSN: 1047-8477 (June 1999).
11. Gowin, W., Saporin, P. I., Kurths, J. & Felsenberg, D. Measures of complexity for cancellous bone. eng. Technology and Health Care: Official Journal of the European Society for Engineering and Med **6**, 373–390. ISSN: 0928-7329 (Dec. 1998).
12. Gao, C., Peng, S., Feng, P. & Shuai, C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. en. Bone Research **5**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 1–33. ISSN: 2095-6231. <https://www.nature.com/articles/boneres201759> (2022) (Dec. 2017).
13. Ott, S. M. Cortical or Trabecular Bone: What's the Difference? American Journal of Nephrology **47**. Publisher: Karger Publishers, 373–375. ISSN: 0250-8095, 1421-9670. <https://www.karger.com/Article/FullText/489672> (2022) (2018).
14. Oftadeh, R., Perez-Viloria, M., Villa-Camacho, J. C., Vaziri, A. & Nazarian, A. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. Journal of Biomechanical Engineering **137**, 0108021–01080215. ISSN: 0148-0731. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5101038/> (2022) (Jan. 2015).
15. Odgaard, A. & Gundersen, H. J. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. eng. Bone **14**, 173–182. ISSN: 8756-3282 (Apr. 1993).
16. Weiner, S. & Traub, W. Bone structure: from angstroms to microns. eng. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Bi **6**, 879–885. ISSN: 0892-6638 (Feb. 1992).
17. Gibson, L. J. The mechanical behaviour of cancellous bone. eng. Journal of Biomechanics **18**, 317–328. ISSN: 0021-9290 (1985).
18. Landis, W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. eng. Bone **16**, 533–544. ISSN: 8756-3282 (May 1995).
19. Keaveny, T. M., Morgan, E. F., Niebur, G. L. & Yeh, O. C. Biomechanics of trabecular bone. eng. Annual Review of Biomedical Engineering **3**, 307–333. ISSN: 1523-9829 (2001).
20. Murugan, R. & Ramakrishna, S. Development of nanocomposites for bone grafting. en. Composites Science and Technology. 20th Anniversary Special Issue **65**, 2385–2406. ISSN: 0266-3538. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026635380500285X> (2022) (Dec. 2005).

21. Bonjour, J.-P. Calcium and Phosphate: A Duet of Ions Playing for Bone Health. Journal of the American College of Nutrition **30**. Publisher: Taylor & Francis
_eprint: <https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719988>, 438S–448S. ISSN: 0731-5724. <https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719988> (2022) (Oct. 2011).
22. Zhu, K. & Prince, R. L. Calcium and bone. eng. Clinical Biochemistry **45**, 936–942. ISSN: 1873-2933 (Aug. 2012).
23. Penido, M. G. M. G. & Alon, U. S. Phosphate homeostasis and its role in bone health. Pediatric Nephrology (Berlin, Germany) **27**, 2039–2048. ISSN: 0931-041X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461213/> (2022) (Nov. 2012).
24. Pellegrino, E. D. & Biltz, R. M. Bone Carbonate and the Ca to P Molar Ratio. en. Nature **219**. Number: 5160 Publisher: Nature Publishing Group, 1261–1262. ISSN: 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/2191261a0> (2022) (Sept. 1968).
25. Tzaphlidou, M. & Zaichick, V. Calcium, phosphorus, calcium-phosphorus ratio in rib bone of healthy humans. eng. Biological Trace Element Research **93**, 63–74. ISSN: 0163-4984 (2003).
26. Peacock, M. Calcium metabolism in health and disease. eng. Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN **5 Suppl 1**, S23–30. ISSN: 1555-905X (Jan. 2010).
27. Shapiro, R. & Heaney, R. P. Co-dependence of calcium and phosphorus for growth and bone development under conditions of varying deficiency. eng. Bone **32**, 532–540. ISSN: 8756-3282 (May 2003).
28. Lataillade, J.-J., Grange, P. B. d. l., Uzan, G. & Bousse-Kerdilès, M.-C. L. Les cellules souches ont-elles l'âge de leur niche ? - À la recherche d'un sérum de jeunesse. . . fr. médecine/sciences **26**. Number: 6-7 Publisher: Éditions EDK, Groupe EDP Sciences, 582–585. ISSN: 0767-0974, 1958-5381. <https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/abs/2010/07/medsci2010266-7p582/medsci2010266-7p582.html> (2022) (June 2010).
29. Ivanovic, Z. & Vlaski-Lafarge, M. en. in Anaerobiosis and Stemness (eds Ivanovic, Z. & Vlaski-Lafarge, M.) 25–37 (Academic Press, Boston, Jan. 2016). ISBN: 978-0-12-800540-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012800540800003X> (2022).
30. Murshed, M. Mechanism of Bone Mineralization. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **8**, a031229. ISSN: 2157-1422. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6280711/> (2022) (Dec. 2018).
31. Orimo, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. eng. Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi **77**, 4–12. ISSN: 1345-4676 (Feb. 2010).

32. Raggio, C. L., Boyan, B. D. & Boskey, A. L. In vivo hydroxyapatite formation induced by lipids. eng. Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone a **1**, 409–415. ISSN: 0884-0431 (Oct. 1986).
33. Aghajanian, P. & Mohan, S. The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. en. Bone Research **6**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 1–9. ISSN: 2095-6231. <http://www.nature.com/articles/s41413-018-0021-z> (2022) (June 2018).
34. Rutkovskiy, A., Stensl kken, K.-O. & Vaage, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. Medical Science Monitor Basic Research **22**, 95–106. ISSN: 2325-4394. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5040224/> (2022) (Sept. 2016).
35. Jensen, E. D., Gopalakrishnan, R. & Westendorf, J. J. Regulation of Gene Expression in Osteoblasts. BioFactors (Oxford, England) **36**, 25–32. ISSN: 0951-6433. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2820584/> (2022) (2010).
36. Delgado-Calle, J. et al. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. en. Bone **49**, 830–838. ISSN: 8756-3282. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328211010477> (2022) (Oct. 2011).
37. Gottrup, F. Physiology and measurement of tissue perfusion. eng. Annales Chirurgiae Et Gynaecologiae **83**, 183–189. ISSN: 0355-9521 (1994).
38. Popel, A. S. THEORY OF OXYGEN TRANSPORT TO TISSUE. Critical reviews in biomedical engineering **17**, 257–321. ISSN: 0278-940X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445261/> (2022) (1989).
39. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. eng. Nature **407**, 249–257. ISSN: 0028-0836 (Sept. 2000).
40. Vaupel, P., Flood, A. B. & Swartz, H. M. Oxygenation Status of Malignant Tumors vs. Normal Tissues: Critical Evaluation and Updated Data Source Based on Direct Measurements with pO₂ Microsensors. en. Applied Magnetic Resonance **52**, 1451–1479. ISSN: 1613-7507. <https://doi.org/10.1007/s00723-021-01383-6> (2022) (Oct. 2021).
41. Wu, P.-H. et al. Cortical bone vessel identification and quantification on contrast-enhanced MR images. en. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery **9**. Publisher: AME Publishing Company, 92841–92941. ISSN: 2223-4306, 2223-4292. <https://qims.amegroups.com/article/view/26463> (2022) (June 2019).
42. Lafage-Proust, M.-H. et al. Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling. BoneKEY Reports **4**, 662. ISSN: 2047-6396. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389660/> (2022) (Apr. 2015).
43. Medical Sciences - 3rd Edition <https://www.elsevier.com/books/medical-sciences/naish/978-0-7020-7337-3> (2022).

44. Rindone, A. N. *et al.* Quantitative 3D imaging of the cranial microvascular environment at single-cell resolution. *en. Nature Communications* **12**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 6219. ISSN: 2041-1723. <http://www.nature.com/articles/s41467-021-26455-w> (2022) (Oct. 2021).
45. Heissig, B. *et al.* Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell* **109**, 625–637. ISSN: 0092-8674. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2826110/> (2022) (May 2002).
46. Genova, T. *et al.* The Crosstalk Between Osteodifferentiating Stem Cells and Endothelial Cells Promotes Angiogenesis and Bone Formation. *Frontiers in Physiology* **10**. ISSN: 1664-042X. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01291> (2022) (2019).
47. Marrella, A. *et al.* Engineering vascularized and innervated bone biomaterials for improved skeletal tissue regeneration. *eng. Materials Today (Kidlington, England)* **21**, 362–376. ISSN: 1369-7021 (May 2018).
48. Brazill, J. M., Beeve, A. T., Craft, C. S., Ivanusic, J. J. & Scheller, E. L. Nerves in Bone: Evolving Concepts in Pain and Anabolism. *eng. Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone a* **34**, 1393–1406. ISSN: 1523-4681 (Aug. 2019).
49. Edoff, K., Hellman, J., Persliden, J. & Hildebrand, C. The developmental skeletal growth in the rat foot is reduced after denervation. *eng. Anatomy and Embryology* **195**, 531–538. ISSN: 0340-2061 (June 1997).
50. Henmi, A., Nakamura, M., Echigo, S. & Sasano, Y. Involvement of sensory neurons in bone defect repair in rats. *eng. Journal of Electron Microscopy* **60**, 393–400. ISSN: 1477-9986 (Dec. 2011).
51. Veldhuis-Vlug, A. G. & Rosen, C. J. Clinical Implications of Bone Marrow Adiposity. *Journal of internal medicine* **283**, 121–139. ISSN: 0954-6820. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5847297/> (2022) (Feb. 2018).
52. Ivanovic, Z. & Vlaski-Lafarge, M. *en. in Anaerobiosis and Stemness* (eds Ivanovic, Z. & Vlaski-Lafarge, M.) 3–15 (Academic Press, Boston, Jan. 2016). ISBN: 978-0-12-800540-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128005408000016> (2022).
53. Okada, S. *et al.* In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *eng. Blood* **80**, 3044–3050. ISSN: 0006-4971 (Dec. 1992).
54. Chan, B. Y., Gill, K. G., Rebsamen, S. L. & Nguyen, J. C. MR Imaging of Pediatric Bone Marrow. *RadioGraphics* **36**. Publisher: Radiological Society of North America, 1911–1930. ISSN: 0271-5333. <https://pubs.rsna.org/doi/full/10.1148/rg.2016160056> (2022) (Oct. 2016).
55. Li, Q., Wu, Y. & Kang, N. Marrow Adipose Tissue: Its Origin, Function, and Regulation in Bone Remodeling and Regeneration. *en. Stem Cells International* **2018**. Publisher: Hindawi, e7098456. ISSN: 1687-966X. <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/7098456/> (2022) (May 2018).

56. Wang, H., Leng, Y. & Gong, Y. Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. Frontiers in Endocrinology **9**. ISSN: 1664-2392. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00694> (2018).
57. Boskey, A. L. & Coleman, R. Aging and bone. eng. Journal of Dental Research **89**, 1333–1348. ISSN: 1544-0591 (Dec. 2010).
58. Mirzaali, M. J. et al. Fatigue-caused damage in trabecular bone from clinical, morphological and mechanical perspectives. en. International Journal of Fatigue **133**, 105451. ISSN: 0142-1123. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142112319305559> (2022) (Apr. 2020).
59. Hattner, R., Epker, B. N. & Frost, H. M. Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. eng. Nature **206**, 489–490. ISSN: 0028-0836 (May 1965).
60. Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I. Bone remodeling. eng. Annals of the New York Academy of Sciences **1092**, 385–396. ISSN: 0077-8923 (Dec. 2006).
61. Kylmaoja, E., Nakamura, M. & Tuukkanen, J. Osteoclasts and Remodeling Based Bone Formation. eng. Current Stem Cell Research & Therapy **11**, 626–633. ISSN: 2212-3946 (2016).
62. Lassus, J. et al. Macrophage activation results in bone resorption. eng. Clinical Orthopaedics and Related Research, 7–15. ISSN: 0009-921X (July 1998).
63. Robling, A. G. & Turner, C. H. Mechanical Signaling for Bone Modeling and Remodeling. Critical reviews in eukaryotic gene expression **19**, 319–338. ISSN: 1045-4403. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3743123/> (2022) (2009).
64. Raggatt, L. J. & Partridge, N. C. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. The Journal of Biological Chemistry **285**, 25103–25108. ISSN: 0021-9258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919071/> (2022) (Aug. 2010).
65. Tominari, T. et al. Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice. Scientific Reports **9**, 6614. ISSN: 2045-2322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6488638/> (2022) (Apr. 2019).
66. Coulombe, J. C., Senwar, B. & Ferguson, V. L. Spaceflight-Induced Bone Tissue Changes that Affect Bone Quality and Increase Fracture Risk. eng. Current Osteoporosis Reports **18**, 1–12. ISSN: 1544-2241 (Feb. 2020).
67. Bonewald, L. F. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. eng. Annals of the New York Academy of Sciences **1116**, 281–290. ISSN: 0077-8923 (Nov. 2007).
68. Gluhak-Heinrich, J. et al. Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo. eng. Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone a **18**, 807–817. ISSN: 0884-0431 (May 2003).

69. Tatsumi, S. *et al.* Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *eng. Cell Metabolism 5*, 464–475. ISSN: 1932-7420 (June 2007).
70. Wein, M. N. & Kronenberg, H. M. Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **8**, a031237. ISSN: 2157-1422. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6071549/> (2022) (Aug. 2018).
71. Feng, X. & Teitelbaum, S. L. Osteoclasts: New Insights. *eng. Bone Research 1*, 11–26. ISSN: 2095-4700 (Mar. 2013).
72. Boyce, B. F., Rosenberg, E., de Papp, A. E. & Duong, L. T. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *eng. European Journal of Clinical Investigation 42*, 1332–1341. ISSN: 1365-2362 (Dec. 2012).
73. Cho, S. W. *et al.* Osteal macrophages support physiologic skeletal remodeling and anabolic actions of parathyroid hormone in bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**. Publisher: Proceedings of the National Academy of Sciences, 1545–1550. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1315153111> (2022) (Jan. 2014).
74. Infante, A. & Rodríguez, C. I. Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* **9**, 244. ISSN: 1757-6512. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0995-x> (2022) (Sept. 2018).
75. Feng, X. & McDonald, J. M. Disorders of Bone Remodeling. *Annual review of pathology* **6**, 121–145. ISSN: 1553-4006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3571087/> (2022) (2011).
76. Larousse, É. Définitions : fracture - Dictionnaire de français Larousse fr. <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/fracture/34943> (2022).
77. Müller, M. E., Koch, P., Nazarian, S. & Schatzker, J. *en. in The Comprehensive Classification of Fractures of Long Bones (eds Müller, M. E., Koch, P., Nazarian, S. & Schatzker, J.) 4–7 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1990). ISBN: 978-3-642-61261-9. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61261-9_2 (2022).*
78. McGuigan, F. X. *en. in Essentials of Orthopedic Surgery (eds Wiesel, S. W. & Delahay, J. N.) 35–73 (Springer, New York, NY, 2011). ISBN: 978-1-4419-1389-0. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1389-0_2 (2022).*
79. Wu, A.-M. *et al.* Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. English. *The Lancet Healthy Longevity* **2**. Publisher: Elsevier, e580–e592. ISSN: 2666-7568. [https://www.thelancet.com/journals/lanhl/article/PIIS2666-7568\(21\)00172-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanhl/article/PIIS2666-7568(21)00172-0/fulltext) (2022) (Sept. 2021).
80. Lee, R. The Outlook for Population Growth. *Science (New York, N.Y.)* **333**, 569–573. ISSN: 0036-8075. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155613/> (2022) (July 2011).

81. Bongaarts, J. Human population growth and the demographic transition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 2985–2990. ISSN: 0962-8436. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2781829/> (2022) (Oct. 2009).
82. Amin, S., Achenbach, S. J., Atkinson, E. J., Khosla, S. & Melton, L. J. Trends in fracture incidence: a population-based study over 20 years. eng. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone a* **29**, 581–589. ISSN: 1523-4681 (Mar. 2014).
83. Bergh, C., Wennergren, D., Möller, M. & Brisby, H. Fracture incidence in adults in relation to age and gender: A study of 27,169 fractures in the Swedish Fracture Register in a well-defined catchment area. en. *PLOS ONE* **15**. Publisher: Public Library of Science, e0244291. ISSN: 1932-6203. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0244291> (2022) (2020).
84. Buhr, A. J. & Cooke, A. M. Fracture patterns. eng. *Lancet (London, England)* **1**, 531–536. ISSN: 0140-6736 (Mar. 1959).
85. Knowelden, J., Buhr, A. J. & Dunbar, O. INCIDENCE OF FRACTURES IN PERSONS OVER 35 YEARS OF AGE. A REPORT TO THE M.R.C. WORKING PARTY ON FRACTURES IN THE ELDERLY. eng. *British Journal of Preventive & Social Medicine* **18**, 130–141. ISSN: 0007-1242 (July 1964).
86. Singer, B. R., McLauchlan, G. J., Robinson, C. M. & Christie, J. Epidemiology of fractures in 15 000 adults. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* **80-B**. Publisher: The British Editorial Society of Bone & Joint Surgery, 243–248. ISSN: 0301-620X. <https://online.boneandjoint.org.uk/doi/abs/10.1302/0301-620X.80B2.0800243> (2022) (Mar. 1998).
87. Byrnes, J. P., Miller, D. C. & Schafer, W. D. Gender differences in risk taking: A meta-analysis. *Psychological Bulletin* **125**. Place: US Publisher: American Psychological Association, 367–383. ISSN: 1939-1455 (1999).
88. Khosla, S., Oursler, M. J. & Monroe, D. G. Estrogen and the Skeleton. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**, 576–581. ISSN: 1043-2760. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3424385/> (2022) (Nov. 2012).
89. Alswat, K. A. Gender Disparities in Osteoporosis. *Journal of Clinical Medicine Research* **9**, 382–387. ISSN: 1918-3003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5380170/> (2022) (May 2017).
90. McCarthy, E. F. Genetic diseases of bones and joints. eng. *Seminars in Diagnostic Pathology* **28**, 26–36. ISSN: 0740-2570 (Feb. 2011).
91. Castillo, R. C., Bosse, M. J., MacKenzie, E. J., Patterson, B. M. & Group, t. L. S. Impact of Smoking on Fracture Healing and Risk of Complications in Limb-Threatening Open Tibia Fractures. en-US. *Journal of Orthopaedic Trauma* **19**, 151–157. ISSN: 0890-5339. https://journals.lww.com/jorthotrauma/Abstract/2005/03000/Impact_of_Smoking_on_Fracture_Healing_and_Risk_of.1.aspx (2022) (Mar. 2005).

92. Chakkalakal, D. A. Alcohol-Induced Bone Loss and Deficient Bone Repair. en. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **29**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1097/01.alc.0000192039.21305.55>, 2077–2090. ISSN: 1530-0277. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1097/01.alc.0000192039.21305.55> (2022) (2005).
93. Karpouzos, A., Diamantis, E., Farmaki, P., Savvanis, S. & Troupis, T. Nutritional Aspects of Bone Health and Fracture Healing. *Journal of Osteoporosis* **2017**, 4218472. ISSN: 2090-8059. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5804294/> (2022) (2017).
94. Marsell, R. & Einhorn, T. A. The biology of fracture healing. eng. *Injury* **42**, 551–555. ISSN: 1879-0267 (June 2011).
95. Kusumbe, A. P., Ramasamy, S. K. & Adams, R. H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* **507**, 323–328. ISSN: 0028-0836. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943525/> (2022) (Mar. 2014).
96. Wildemann, B. et al. Non-union bone fractures. en. *Nature Reviews Disease Primers* **7**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 1–21. ISSN: 2056-676X. <https://www.nature.com/articles/s41572-021-00289-8> (2022) (Aug. 2021).
97. Schemitsch, E. H. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! eng. *Journal of Orthopaedic Trauma* **31 Suppl 5**, S20–S22. ISSN: 1531-2291 (Oct. 2017).
98. Nauth, A., Schemitsch, E., Norris, B., Nollin, Z. & Watson, J. T. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? en-US. *Journal of Orthopaedic Trauma* **32**, S7. ISSN: 0890-5339. https://journals.lww.com/jorthotrauma/fulltext/2018/03003/critical_size_bone_defects__is_there_a_consensus.2.aspx (2022) (Mar. 2018).
99. Turgut, A. et al. Effect of COVID-19 pandemic on the fracture demographics: Data from a tertiary care hospital in Turkey. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* **54**, 355–363. ISSN: 1017-995X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7444871/> (2022) (July 2020).
100. Khan, S. N. et al. The biology of bone grafting. eng. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* **13**, 77–86. ISSN: 1067-151X (Feb. 2005).
101. Kakiuchi, M. & Ono, K. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. en. *International Orthopaedics* **20**, 147–152. ISSN: 1432-5195. <https://doi.org/10.1007/s002640050052> (2022) (June 1996).
102. Vangsness, C. T., Wagner, P. P., Moore, T. M. & Roberts, M. R. Overview of safety issues concerning the preparation and processing of soft-tissue allografts. eng. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Society of North America* **22**, 1351–1358. ISSN: 1526-3231 (Dec. 2006).

103. Moreau, A., Varey, E., Anegon, I. & Cuturi, M.-C. Effector Mechanisms of Rejection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, a015461. ISSN: 2157-1422. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3808773/> (2022) (Nov. 2013).
104. Shegarfi, H. & Reikeras, O. Review article: bone transplantation and immune response. *eng. Journal of Orthopaedic Surgery (Hong Kong)* **17**, 206–211. ISSN: 2309-4990 (Aug. 2009).
105. San Julián, M. & Valentí, A. [Bone transplant]. *spa. Anales Del Sistema Sanitario De Navarra* **29 Suppl 2**, 125–136. ISSN: 1137-6627 (2006).
106. Lewis, A. et al. Organ donation in the US and Europe: The supply vs demand imbalance. *en. Transplantation Reviews* **35**, 100585. ISSN: 0955-470X. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955470X20300586> (2022) (Apr. 2021).
107. Leung, H.-B., Fok, M. W.-M., Chow, L. C.-Y. & Yen, C.-H. Cost comparison of femoral head banking versus bone substitutes. *eng. Journal of Orthopaedic Surgery (Hong Kong)* **18**, 50–54. ISSN: 2309-4990 (Apr. 2010).
108. Cooper, D. K. C., Ekser, B. & Tector, A. J. A brief history of clinical xenotransplantation. *en. International Journal of Surgery. Special Issue: Xenotransplantation* **23**, 205–210. ISSN: 1743-9191. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743919115003337> (2022) (Nov. 2015).
109. Sykes, M. & Sachs, D. H. Transplanting organs from pigs to humans. *Science immunology* **4**, eaau6298. ISSN: 2470-9468. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293579/> (2022) (Nov. 2019).
110. Eisenson, D. L., Hisadome, Y. & Yamada, K. Progress in Xenotransplantation: Immunologic Barriers, Advances in Gene Editing, and Successful Tolerance Induction Strategies in Pig-To-Primate Transplantation. *Frontiers in Immunology* **13**. ISSN: 1664-3224. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.899657> (2022) (2022).
111. Govoni, M. et al. Commercial Bone Grafts Claimed as an Alternative to Autografts: Current Trends for Clinical Applications in Orthopaedics. *en. Materials* **14**. Number: 12 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 3290. ISSN: 1996-1944. <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/12/3290> (2022) (Jan. 2021).
112. Sallent, I. et al. The Few Who Made It: Commercially and Clinically Successful Innovative Bone Grafts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**. ISSN: 2296-4185. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.00952> (2022) (2020).
113. Abraham, C. M. A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments. *The Open Dentistry Journal* **8**, 50–55. ISSN: 1874-2106. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4040928/> (2022) (May 2014).

114. Bone grafts, derivatives, and substitutes English (eds Urist, M. R., O'Connor, B. T. & Burwell, R. G.) OCLC: 28294098. ISBN: 978-0-7506-1369-9 (Butterworth-Heinemann, Oxford; Boston, 1994).
115. Albrektsson, T. & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. eng. European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spine Society **10 Suppl 2**, S96–101. ISSN: 0940-6719 (Oct. 2001).
116. Ghosh, S., Sanghavi, S. & Sancheti, P. en. in Fundamental Biomaterials: Metals (eds Balakrishnan, P., M s, S. & Thomas, S.) 139–165 (Woodhead Publishing, Jan. 2018). ISBN: 978-0-08-102205-4. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081022054000064> (2022).
117. Abdulghani, S. & Mitchell, G. R. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. eng. Biomolecules **9**, E750. ISSN: 2218-273X (Nov. 2019).
118. Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. Bone substitutes: an update. eng. Injury **36 Suppl 3**, S20–27. ISSN: 0020-1383 (Nov. 2005).
119. Canillas, M., Pena, P., de Aza, A. H. & Rodríguez, M. A. Calcium phosphates for biomedical applications. en. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio **56**, 91–112. ISSN: 0366-3175. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0366317517300444> (2022) (May 2017).
120. Dorozhkin, S. V. A detailed history of calcium orthophosphates from 1770s till 1950. eng. Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications **33**, 3085–3110. ISSN: 1873-0191 (Aug. 2013).
121. Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C. & Greenlee, T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. en. Journal of Biomedical Materials Research **5**. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.820050611>, 117–141. ISSN: 1097-4636. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.820050611> (2022) (1971).
122. Fernandes, H. R. et al. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. Materials **11**, 2530. ISSN: 1996-1944. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316906/> (2022) (Dec. 2018).
123. Crush, J., Hussain, A., Seah, K. T. M. & Khan, W. S. Bioactive Glass: Methods for Assessing Angiogenesis and Osteogenesis. Frontiers in Cell and Developmental Biology **9**. ISSN: 2296-634X. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.643781> (2022) (2021).
124. Zhou, X., Zhang, N., Mankoci, S. & Sahai, N. Silicates in orthopedics and bone tissue engineering materials. en. Journal of Biomedical Materials Research Part A **105**. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.a.36061>, 2090–2102. ISSN: 1552-4965. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.36061> (2022) (2017).

125. Clarke, F. W. & Washington, H. S. The composition of the Earth's crust. Professional Paper. Number: 127. ISSN: 2330-7102. <https://pubs.er.usgs.gov/publication/pp127> (2022) (1924).
126. Jugdaohsingh, R. Silicon and bone health. eng. The Journal of Nutrition, Health & Aging **11**, 99–110. ISSN: 1279-7707 (Apr. 2007).
127. Carlisle, E. M. Silicon: a possible factor in bone calcification. eng. Science (New York, N.Y.) **167**, 279–280. ISSN: 0036-8075 (Jan. 1970).
128. Schwarz, K. & Milne, D. B. Growth-promoting Effects of Silicon in Rats. en. Nature **239**. Number: 5371 Publisher: Nature Publishing Group, 333–334. ISSN: 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/239333a0> (2022) (Oct. 1972).
129. Gao, T., Aro, H. T., Ylänen, H. & Vuorio, E. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. eng. Biomaterials **22**, 1475–1483. ISSN: 0142-9612 (June 2001).
130. Reffitt, D. M. et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. eng. Bone **32**, 127–135. ISSN: 8756-3282 (Feb. 2003).
131. Hench, L. L. en. in Sol-Gel Silica (ed Hench, L. L.) 117–132 (William Andrew Publishing, Westwood, NJ, Jan. 1998). ISBN: 978-0-8155-1419-0. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780815514190500115> (2022).
132. Hott, M., de Pollak, C., Modrowski, D. & Marie, P. J. Short-term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats. eng. Calcified Tissue International **53**, 174–179. ISSN: 0171-967X (Sept. 1993).
133. Hielsen, F. H. & Poellot, R. Dietary silicon affects bone turnover differently in ovariectomized and sham-operated growing rats. English. The journal of trace elements in experimental medicine. ISSN: 1520-670X. <http://dx.doi.org/10.1002/jtra.20004> (2022) (2004).
134. Ha, S.-W., Weitzmann, M. N. & Beck, G. R. J. Bioactive Silica Nanoparticles Promote Osteoblast Differentiation through Stimulation of Autophagy and Direct Association with LC3 and p62. ACS Nano **8**. Publisher: American Chemical Society, 5898–5910. ISSN: 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/nn5009879> (2022) (June 2014).
135. Zhou, X. et al. Orthosilicic acid, Si(OH)₄, stimulates osteoblast differentiation in vitro by upregulating miR-146a to antagonize NF- κ B activation. eng. Acta Biomaterialia **39**, 192–202. ISSN: 1878-7568 (July 2016).
136. Tissue engineering: proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, Fe English (eds Skalak, R. & Fox, C. F.) OCLC: 18560607. ISBN: 978-0-8451-4706-1 (Liss, New York, 1988).
137. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. eng. Science (New York, N.Y.) **260**, 920–926. ISSN: 0036-8075 (May 1993).

138. Fritz, M. *et al.* Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates. en. *Nature* **371**. Number: 6492 Publisher: Nature Publishing Group, 49–51. ISSN: 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/371049a0> (2022) (Sept. 1994).
139. Groll, J. *et al.* Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. eng. *Biofabrication* **8**, 013001. ISSN: 1758-5090 (Jan. 2016).
140. Guillemot, F., Mironov, V. & Nakamura, M. Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). eng. *Biofabrication* **2**, 010201. ISSN: 1758-5090 (Mar. 2010).
141. Naveau, A. *et al.* A Bibliometric Study to Assess Bioprinting Evolution. en. *Applied Sciences* **7**. Number: 12 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1331. ISSN: 2076-3417. <https://www.mdpi.com/2076-3417/7/12/1331> (2022) (Dec. 2017).
142. Groll, J. *et al.* A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. en. *Biofabrication* **11**. Publisher: IOP Publishing, 013001. ISSN: 1758-5090. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaec52> (2021) (Nov. 2018).
143. Santoni, S., Gugliandolo, S. G., Sponchioni, M., Moscatelli, D. & Colosimo, B. M. 3D bioprinting: current status and trends—a guide to the literature and industrial practice. en. *Bio-Design and Manufacturing* **5**, 14–42. ISSN: 2522-8552. <https://doi.org/10.1007/s42242-021-00165-0> (2022) (Jan. 2022).
144. Pedroza-González, S. C., Rodriguez-Salvador, M., Benítez, B. E. P., Alvarez, M. M. & Santiago, G. T.-d. Bioinks for 3D Bioprinting: A Scientometric Analysis of Two Decades of Progress. en-US. *International Journal of Bioprinting* **7**. Publisher: Whioce. <https://ijb.whioce.com/index.php/int-j-bioprinting/article/view/337> (2022) (Apr. 2021).
145. Ng, W. L., Chua, C. K. & Shen, Y.-F. Print Me An Organ! Why We Are Not There Yet. en. *Progress in Polymer Science* **97**, 101145. ISSN: 0079-6700. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967001930156X> (2022) (Oct. 2019).
146. Gillispie, G. *et al.* Assessment Methodologies for Extrusion-Based Bioink Printability. *Biofabrication* **12**, 022003. ISSN: 1758-5082. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7039534/> (2022) (Feb. 2020).
147. Melchels, F. P. W., Feijen, J. & Grijpma, D. W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. en. *Biomaterials* **31**, 6121–6130. ISSN: 0142-9612. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210005661> (2022) (Aug. 2010).
148. Li, X. *et al.* Inkjet Bioprinting of Biomaterials. *Chemical Reviews* **120**. Publisher: American Chemical Society, 10793–10833. ISSN: 0009-2665. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00008> (2022) (Oct. 2020).

149. Boularaoui, S., Al Hussein, G., Khan, K. A., Christoforou, N. & Stefanini, C. An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. en. Bioprinting **20**, e00093. ISSN: 2405-8866. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405886620300208> (2022) (Dec. 2020).
150. Knowlton, S., Anand, S., Shah, T. & Tasoglu, S. Bioprinting for Neural Tissue Engineering. eng. Trends in Neurosciences **41**, 31–46. ISSN: 1878-108X (Jan. 2018).
151. Organization, W. H. Principales causes de décès dans le monde 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
152. Cally, O., Young, D. J. & Loh, X. J. en. in Biodegradable Thermogels 1–22 (Sept. 2018). <https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781782629405-00001/978-1-78262-940-5> (2022).
153. Chen, Z. et al. 3D printing of ceramics: A review. en. Journal of the European Ceramic Society **39**, 661–687. ISSN: 0955-2219. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955221918306782> (2022) (Apr. 2019).
154. Miranda, P., Saiz, E., Gryn, K. & Tomsia, A. P. Sintering and robocasting of -tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications. en. Acta Biomaterialia **2**, 457–466. ISSN: 1742-7061. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706106000225> (2022) (July 2006).
155. Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D. & Ozbolat, I. T. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. en. Biotechnology Advances **35**, 217–239. ISSN: 0734-9750. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975016301719> (2022) (Mar. 2017).
156. Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. en. Journal of Advanced Research **6**, 105–121. ISSN: 2090-1232. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000969> (2022) (Mar. 2015).
157. Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V. & Ciardelli, G. Collagen for bone tissue regeneration. en. Acta Biomaterialia **8**, 3191–3200. ISSN: 1742-7061. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112002620> (2022) (Sept. 2012).
158. Liu, M. et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. eng. Bone Research **5**, 17014. ISSN: 2095-4700 (2017).
159. Li, Y., Rodrigues, J. & Tomás, H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. eng. Chemical Society Reviews **41**, 2193–2221. ISSN: 1460-4744 (Mar. 2012).
160. Kondiah, P. J. et al. A Review of Injectable Polymeric Hydrogel Systems for Application in Bone Tissue Engineering. eng. Molecules (Basel, Switzerland) **21**, E1580. ISSN: 1420-3049 (Nov. 2016).

161. Nicodemus, G. D. & Bryant, S. J. Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. Tissue Engineering. Part B, Reviews **14**, 149–165. ISSN: 1937-3368. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2962861/> (2022) (June 2008).
162. Clover, J. & Gowen, M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? eng. Bone **15**, 585–591. ISSN: 8756-3282 (Dec. 1994).
163. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. eng. Experimental Hematology **4**, 267–274. ISSN: 0301-472X (Sept. 1976).
164. Mohamed-Ahmed, S. et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. Stem Cell Research & Therapy **9**, 168. ISSN: 1757-6512. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1> (2022) (June 2018).
165. Ullah, I., Subbarao, R. B. & Rho, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. Bioscience Reports **35**, e00191. ISSN: 0144-8463. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413017/> (2022) (Apr. 2015).
166. Dominici, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. eng. Cytotherapy **8**, 315–317. ISSN: 1465-3249 (2006).
167. Ruparel, N. B., de Almeida, J. F. A., Henry, M. A. & Diogenes, A. Characterization of a Stem Cell of Apical Papilla Cell Line: Effect of Passage on Cellular Phenotype. en. Journal of Endodontics **39**, 357–363. ISSN: 0099-2399. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239912010072> (2022) (Mar. 2013).
168. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. eng. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**, 13625–13630. ISSN: 0027-8424 (Dec. 2000).
169. Miura, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. eng. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**, 5807–5812. ISSN: 0027-8424 (May 2003).
170. Seo, B.-M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. eng. Lancet (London, England) **364**, 149–155. ISSN: 1474-547X (July 2004).
171. Morsczeck, C. et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. eng. Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology **24**, 155–165. ISSN: 0945-053X (Apr. 2005).
172. Matsubara, T. et al. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. eng. Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone a **20**, 399–409. ISSN: 0884-0431 (Mar. 2005).

173. Ikeda, E. et al. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. eng. Differentiation; Research in Biological Diversity **76**, 495–505. ISSN: 1432-0436 (May 2008).
174. Sonoyama, W. et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. eng. Journal of Endodontics **34**, 166–171. ISSN: 0099-2399 (Feb. 2008).
175. Zhang, Q. et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **183**, 7787–7798. ISSN: 0022-1767. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881945/> (2022) (Dec. 2009).
176. Kong, H. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: The Novel Therapeutic Option for Regenerative Dentistry. en. Stem Cell Reviews and Reports. ISSN: 2629-3277. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10342-y> (2022) (Feb. 2022).
177. Chalisserry, E. P., Nam, S. Y., Park, S. H. & Anil, S. Therapeutic potential of dental stem cells. Journal of Tissue Engineering **8**, 2041731417702531. ISSN: 2041-7314. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5461911/> (2022) (May 2017).
178. Bojic, S., Volarevic, V., Ljubic, B. & Stojkovic, M. Dental stem cells—characteristics and potential. Histology and histopathology (2014).
179. Bakopoulou, A. et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). eng. Archives of Oral Biology **56**, 709–721. ISSN: 1879-1506 (July 2011).
180. Chen, K., Xiong, H., Huang, Y. & Liu, C. Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs). en. Archives of Oral Biology **58**, 997–1006. ISSN: 0003-9969. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000399691300068X> (2022) (Aug. 2013).
181. WinningLewis, A, E. K. & T, L. A Comparative Analysis of the Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells. en. Stem Cells and Development. Publisher: Mary Ann Liebert, Inc., publishers 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2019.0023> (2022) (July 2019).
182. Roux, S., Leotot, J., Chevallier, N., Bierling, P. & Rouard, H. Cellules stromales mésenchymateuses : propriétés biologiques et perspectives thérapeutiques. fr. Transfusion Clinique et Biologique **18**, 1–12. ISSN: 1246-7820. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1246782011000024> (2022) (Feb. 2011).
183. Shi, S., Robey, P. G. & Gronthos, S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. eng. Bone **29**, 532–539. ISSN: 8756-3282 (Dec. 2001).

184. Yamada, Y., Fujimoto, A., Ito, A., Yoshimi, R. & Ueda, M. Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. eng. Biomaterials **27**, 3766–3781. ISSN: 0142-9612 (July 2006).
185. Dong, R., Yao, R., Du, J., Wang, S. & Fan, Z. Depletion of histone demethylase KDM2A enhanced the adipogenic and chondrogenic differentiation potentials of stem cells from apical papilla. eng. Experimental Cell Research **319**, 2874–2882. ISSN: 1090-2422 (Nov. 2013).
186. Nada, O. A. & El Backly, R. M. Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology **6**, 103. ISSN: 2296-4185. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6066565/> (2022) (July 2018).
187. Huang, G. T.-J., Gronthos, S. & Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. eng. Journal of Dental Research **88**, 792–806. ISSN: 1544-0591 (Sept. 2009).
188. Lertchirakarn, V. & Aguilar, P. Effects of Lipopolysaccharide on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla. eng. Journal of Endodontics **43**, 1835–1840. ISSN: 1878-3554 (Nov. 2017).
189. Ready, J. F. en. in Industrial Applications of Lasers (Second Edition) (ed Ready, J. F.) 1–30 (Academic Press, San Diego, Jan. 1997). ISBN: 978-0-12-583961-7. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012583961750003X> (2022).
190. Gordon, J. P., Zeiger, H. J. & Townes, C. H. The Maser—New Type of Microwave Amplifier, Frequency Standard, and Spectrometer. Physical Review **99**. Publisher: American Physical Society, 1264–1274. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.99.1264> (2022) (Aug. 1955).
191. Einstein, A. Strahlungs-Emission und Absorption nach der Quantentheorie. Deutsche Physikalische Gesellschaft **18**. ADS Bibcode: 1916DPhyG..18..318E, 318–323. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1916DPhyG..18..318E> (2022) (Jan. 1916).
192. Maiman, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. en. Nature **187**. Number: 4736 Publisher: Nature Publishing Group, 493–494. ISSN: 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/187493a0> (2022) (Aug. 1960).
193. Series, G. W. Thirty years of optical pumping. Contemporary Physics **22**. Publisher: Taylor & Francis _eprint: <https://doi.org/10.1080/00107518108231547>, 487–509. ISSN: 0010-7514. <https://doi.org/10.1080/00107518108231547> (2022) (Sept. 1981).
194. Levene, M. L., Scott, R. D. & Siryj, B. W. Material Transfer Recording. EN. Applied Optics **9**. Publisher: Optica Publishing Group, 2260–2265. ISSN: 2155-3165. <https://opg.optica.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-9-10-2260> (2022) (Oct. 1970).

195. Bohandy, J., Kim, B. F. & Adrian, F. J. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. *Journal of Applied Physics* **60**. Publisher: American Institute of Physics, 1538–1539. ISSN: 0021-8979. <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.337287> (2022) (Aug. 1986).
196. Kérourédan, O., Rémy, M., Oliveira, H., Guillemot, F. & Devillard, R. en. in *Laser Printing of Functional Materials* Section: 15 _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9783527805105.ch15>, 349–373 (John Wiley & Sons, Ltd, 2018). ISBN: 978-3-527-80510-5. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527805105.ch15> (2022).
197. Fogarassy, E. et al. Deposition of high Tc YBaCuO and BiSrCaCuO superconducting thin films by pulsed excimer laser evaporation. en. *Solid State Communications* **67**, 975–979. ISSN: 0038-1098. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038109888904693> (2022) (Sept. 1988).
198. Fernández-Pradas, J. M., Colina, M., Serra, P., Domínguez, J. & Morenza, J. L. Laser-induced forward transfer of biomolecules. en. *Thin Solid Films. Proceedings of Symposium H on Photonic Processing of Surfaces, Thin Films and Devices, of the E-MRS 2003 Spring Conference* **453-454**, 27–30. ISSN: 0040-6090. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040609003016432> (2022) (Apr. 2004).
199. Unger, C., Gruene, M., Koch, L., Koch, J. & Chichkov, B. N. Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer. en. *Applied Physics A* **103**, 271–277. ISSN: 1432-0630. <https://doi.org/10.1007/s00339-010-6030-4> (2022) (May 2011).
200. Barron, J. A., Wu, P., Ladouceur, H. D. & Ringeisen, B. R. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. eng. *Biomedical Microdevices* **6**, 139–147. ISSN: 1387-2176 (June 2004).
201. Colina, M., Serra, P., Fernández-Pradas, J. M., Sevilla, L. & Morenza, J. L. DNA deposition through laser induced forward transfer. en. *Biosensors and Bioelectronics. Selected Papers from the Eighth World Congress on Biosensors, Part I* **20**, 1638–1642. ISSN: 0956-5663. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566304003720> (2022) (Feb. 2005).
202. Antoshin, A. A. et al. LIFT-bioprinting, is it worth it? en. *Bioprinting* **15**, e00052. ISSN: 2405-8866. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S240588661930017X> (2022) (Sept. 2019).
203. Hopp, B. et al. Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. eng. *Tissue Engineering* **11**, 1817–1823. ISSN: 1076-3279 (Dec. 2005).
204. Wu, P. K. et al. The deposition, structure, pattern deposition, and activity of biomaterial thin-films by matrix-assisted pulsed-laser evaporation (MAPLE) and MAPLE direct write. en. *Thin Solid Films. Proceedings of the 28th International Conference on Metallurgic Coatings and Thin Films* **398-399**, 607–614. ISSN: 0040-6090. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040609003016432>

- [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040609001013475](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040609001013475) (2022) (Nov. 2001).
205. Duocastella, M., Fernández-Pradas, J. M., Morenza, J. L., Zafra, D. & Serra, P. Novel laser printing technique for miniaturized biosensors preparation. en. *Sensors and Actuators B: Chemical* **145**, 596–600. ISSN: 0925-4005. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400509009204> (2022) (Mar. 2010).
 206. Brujan, E.-A., Nahen, K., Schmidt, P. & Vogel, A. Dynamics of laser-induced cavitation bubbles near an elastic boundary. en. *Journal of Fluid Mechanics* **433**. Publisher: Cambridge University Press, 251–281. ISSN: 1469-7645, 0022-1120. <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-fluid-mechanics/article/abs/dynamics-of-laserinduced-cavitation-bubbles-near-an-elastic-boundary/51F6F1756B9FBE286212289079C7AE39> (2022) (Apr. 2001).
 207. Akhatov, I. et al. Dynamics of laser-induced cavitation bubbles. en. *Experimental Thermal and Fluid Science* **26**, 731–737. ISSN: 0894-1777. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0894177702001826> (2022) (Aug. 2002).
 208. Akhatov, I. et al. Collapse and rebound of a laser-induced cavitation bubble. *Physics of Fluids* **13**. Publisher: American Institute of Physics, 2805–2819. ISSN: 1070-6631. <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1401810> (2022) (Oct. 2001).
 209. Rayleigh, L. VIII. On the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **34**. Publisher: Taylor & Francis _eprint: <https://doi.org/10.1080/14786440808635681>, 94–98. ISSN: 1941-5982. <https://doi.org/10.1080/14786440808635681> (2022) (Aug. 1917).
 210. Plesset, M. S. The Dynamics of Cavitation Bubbles. *Journal of Applied Mechanics* **16**, 277–282. ISSN: 0021-8936. <https://doi.org/10.1115/1.4009975> (2022) (1949).
 211. Blake, J. R. & Gibson, D. C. Growth and collapse of a vapour cavity near a free surface. en. *Journal of Fluid Mechanics* **111**. Publisher: Cambridge University Press, 123–140. ISSN: 1469-7645, 0022-1120. <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-fluid-mechanics/article/abs/growth-and-collapse-of-a-vapour-cavity-near-a-free-surface/EE1C5B33902AAC9B94E095E4A2F5C243#access-block> (2022) (Oct. 1981).
 212. Duocastella, M., Patrascioiu, A., Fernández-Pradas, J. M., Morenza, J. L. & Serra, P. Film-free laser forward printing of transparent and weakly absorbing liquids. EN. *Optics Express* **18**. Publisher: Optica Publishing Group, 21815–21825. ISSN: 1094-4087. <https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-18-21-21815> (2022) (Oct. 2010).

213. Cerbus, R. T. *et al.* Experimental and numerical study of laser-induced secondary jetting. en. *Journal of Fluid Mechanics* **934**. Publisher: Cambridge University Press, A14. ISSN: 0022-1120, 1469-7645. <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-fluid-mechanics/article/abs/experimental-and-numerical-study-of-laserinduced-secondary-jetting/BD9CC5D6C307319ADA10F6F109E26347> (2022) (Mar. 2022).
214. Plateau, J. A. F. *Statique expérimentale et théorique des liquides soumis aux seules forces moléculaires*. <http://archive.org/details/statiqueexprime00platgoog> (2022) (Paris, Gauthier-Villars, 1873).
215. Brennen, C. E. *Cavitation and Bubble Dynamics* en. ISBN: 978-0-19-509409-1. <https://resolver.caltech.edu/CaltechB00K:1995.001> (2022) (Oxford University Press, New York, Jan. 1995).
216. Zhang, Z., Xu, C., Xiong, R., Chrisey, D. B. & Huang, Y. Effects of living cells on the bioink printability during laser printing. *Biomicrofluidics* **11**. Publisher: American Institute of Physics, 034120. <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4985652> (2022) (May 2017).
217. Turkoz, E., Kang, S., Deike, L. & Arnold, C. B. Subthreshold laser jetting via flow-focusing in laser-induced forward transfer. *Physical Review Fluids* **3**. Publisher: American Physical Society, 082201. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevFluids.3.082201> (2022) (Aug. 2018).
218. Yan, J., Huang, Y., Xu, C. & Chrisey, D. B. Effects of fluid properties and laser fluence on jet formation during laser direct writing of glycerol solution. *Journal of Applied Physics* **112**. Publisher: American Institute of Physics, 083105. ISSN: 0021-8979. <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4759344> (2022) (Oct. 2012).
219. Young, D., Auyeung, R. C. Y., Piqué, A., Chrisey, D. B. & Dlott, D. D. Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy. en. *Applied Surface Science*. *COLA'01 SI* **197-198**, 181–187. ISSN: 0169-4332. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433202003227> (2022) (Sept. 2002).
220. Ventura, R. D. An Overview of Laser-assisted Bioprinting (LAB) in Tissue Engineering Applications. en. *Medical Lasers; Engineering, Basic Research, and Clinical Application* **10**. Publisher: Korean Society of Laser Medicine and Surgery, 76–81. <https://www.jkslms.or.kr/journal/view.html?doi=10.25289/ML.2021.10.2.76> (2022) (June 2021).
221. Dou, C. *et al.* A State-of-the-Art Review of Laser-Assisted Bioprinting and its Future Research Trends. en. *ChemBioEng Reviews* **8**. *eprint*: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cben.202000037>, 517–534. ISSN: 2196-9744. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cben.202000037> (2022) (2021).

222. Singh, S., Choudhury, D., Yu, F., Mironov, V. & Naing, M. W. In situ bioprinting - Bioprinting from benchside to bedside? eng. Acta Biomaterialia **101**, 14–25. ISSN: 1878-7568 (Jan. 2020).
223. Ashammakhi, N. et al. In situ three-dimensional printing for reparative and regenerative therapy. eng. Biomedical Microdevices **21**, 42. ISSN: 1572-8781 (Apr. 2019).
224. Moncal, K. K. et al. Intra-Operative Bioprinting of Hard, Soft, and Hard/Soft Composite Tissues for Craniomaxillofacial Reconstruction. en. Advanced Functional Materials **31**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adfm.202010858>, 2010858. ISSN: 1616-3028. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adfm.202010858> (2022) (2021).
225. Li, L. et al. Robotic in situ 3D bio-printing technology for repairing large segmental bone defects. eng. Journal of Advanced Research **30**, 75–84. ISSN: 2090-1224 (May 2021).
226. Di Bella, C. et al. In situ handheld three-dimensional bioprinting for cartilage regeneration. en. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine **12**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/term.2476>, 611–621. ISSN: 1932-7005. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/term.2476> (2022) (2018).
227. Albanna, M. et al. In Situ Bioprinting of Autologous Skin Cells Accelerates Wound Healing of Extensive Excisional Full-Thickness Wounds. en. Scientific Reports **9**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 1856. ISSN: 2045-2322. <http://www.nature.com/articles/s41598-018-38366-w> (2022) (Feb. 2019).
228. Skardal, A. et al. A tunable hydrogel system for long-term release of cell-secreted cytokines and bioprinted in situ wound cell delivery. en. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **105**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.b.33736>, 1986–2000. ISSN: 1552-4981. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.b.33736> (2022) (2017).
229. Kim, J., McKee, J. A., Fontenot, J. J. & Jung, J. P. Engineering Tissue Fabrication With Machine Intelligence: Generating a Blueprint for Regeneration. eng. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology **7**, 443. ISSN: 2296-4185 (2019).
230. Guillemot, F., Souquet, A., Catros, S. & Guillotin, B. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. eng. Nanomedicine (London, England) **5**, 507–515. ISSN: 1748-6963 (Apr. 2010).
231. Guillotin, B. et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. eng. Biomaterials **31**, 7250–7256. ISSN: 1878-5905 (Oct. 2010).
232. Catros, S. et al. Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. eng. Biofabrication **3**, 025001. ISSN: 1758-5090 (June 2011).
233. Devillard, R. et al. Cell patterning by laser-assisted bioprinting. eng. Methods in Cell Biology **119**, 159–174. ISSN: 0091-679X (2014).

234. Ali, M., Pages, E., Ducom, A., Fontaine, A. & Guillemot, F. Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution. eng. Biofabrication **6**, 045001. ISSN: 1758-5090 (Sept. 2014).
235. Bourget, J.-M. et al. Patterning of Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells by Laser-Assisted Bioprinting to Study Cell Migration. eng. BioMed Research International **2016**, 3569843. ISSN: 2314-6141 (2016).
236. Keriquel, V. et al. In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. eng. Scientific Reports **7**, 1778. ISSN: 2045-2322 (May 2017).
237. Kérourédan, O. et al. Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by laser-assisted bioprinting. eng. Journal of Materials Science. Materials in Medicine **30**, 28. ISSN: 1573-4838 (Feb. 2019).
238. Kérourédan, O. et al. In situ prevascularization designed by laser-assisted bioprinting: effect on bone regeneration. eng. Biofabrication **11**, 045002. ISSN: 1758-5090 (July 2019).
239. Koch, L. et al. Laser Printing of Skin Cells and Human Stem Cells. Tissue Engineering Part C: Methods **16**. Publisher: Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 847–854. ISSN: 1937-3384. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tec.2009.0397> (2022) (Oct. 2010).
240. Gruene, M. et al. Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts. Tissue Engineering Part C: Methods **17**. Publisher: Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 79–87. ISSN: 1937-3384. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tec.2010.0359> (2022) (Jan. 2011).
241. Xiong, R., Zhang, Z., Chai, W., Chrisey, D. B. & Huang, Y. Study of gelatin as an effective energy absorbing layer for laser bioprinting. en. Biofabrication **9**. Publisher: IOP Publishing, 024103. ISSN: 1758-5090. <https://dx.doi.org/10.1088/1758-5090/aa74f2> (2022) (June 2017).
242. Doraiswamy, A. et al. Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites. en. Journal of Biomedical Materials Research Part A **80A**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.a.30969>, 635–643. ISSN: 1522-4965. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.30969> (2022) (2007).
243. Porter, J. R., Ruckh, T. T. & Popat, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. en. Biotechnology Progress **25**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/btpr.246>, 1539–1560. ISSN: 1520-6033. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.246> (2022) (2009).
244. García-Gareta, E., Coathup, M. J. & Blunn, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. eng. Bone **81**, 112–121. ISSN: 1873-2763 (Dec. 2015).
245. Hench, L. L. & Polak, J. M. Third-generation biomedical materials. eng. Science (New York, N.Y.) **295**, 1014–1017. ISSN: 1095-9203 (Feb. 2002).

246. Götz, W., Tobiasch, E., Witzleben, S. & Schulze, M. Effects of Silicon Compounds on Biomineralization, Osteogenesis, and Hard Tissue Formation. *Pharmaceutics* **11**, 117. ISSN: 1999-4923. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471146/> (2022) (Mar. 2019).
247. Vallet-Regí, M. & Balas, F. Silica Materials for Medical Applications. *The Open Biomedical Engineering Journal* **2**, 1–9. ISSN: 1874-1207. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701070/> (2022) (Jan. 2008).
248. Korpela, M., Riikonen, N., Piili, H., Salminen, A. & Nyrrhilä, O. en. in *Technical, Economic and Societal Effects of Manufacturing 4.0: Automation, Adaption and Man* (eds Collan, M. & Michelsen, K.-E.) 17–41 (Springer International Publishing, Cham, 2020). ISBN: 978-3-030-46103-4. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46103-4_2 (2022).
249. Qu, H. Additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. en. *Materials Today Communications* **24**, 101024. ISSN: 2352-4928. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352492820305456> (2022) (Sept. 2020).
250. Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V. & Laurencin, C. T. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Advanced healthcare materials* **4**, 1268–1285. ISSN: 2192-2640. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507442/> (2022) (June 2015).
251. Khan, A. F. *et al.* Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. eng. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* **35**, 245–252. ISSN: 1873-0191 (Feb. 2014).
252. Al-Harbi, N. *et al.* Silica-Based Bioactive Glasses and Their Applications in Hard Tissue Regeneration: A Review. eng. *Pharmaceutics (Basel, Switzerland)* **14**, 75. ISSN: 1424-8247 (Jan. 2021).
253. Sanmartin de Almeida, M., Fernandes, G. V. d. O., de Oliveira, A. M. & Granjeiro, J. M. Calcium silicate as a graft material for bone fractures: a systematic review. *The Journal of International Medical Research* **46**, 2537–2548. ISSN: 0300-0605. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6124267/> (2022) (July 2018).
254. SAGHIRI, M. A. *et al.* Calcium silicate-based cements and functional impacts of various constituents. *Dental materials journal* **36**, 8–18. ISSN: 0287-4547. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5293667/> (2022) (Jan. 2017).
255. Khalil, I., Naaman, A. & Camilleri, J. Properties of Tricalcium Silicate Sealers. eng. *Journal of endodontics* **42**. Place: United States, 1529–1535. ISSN: 1878-3554 0099-2399 (Oct. 2016).
256. Reszka, P. *et al.* A Comparative Chemical Study of Calcium Silicate-Containing and Epoxy Resin-Based Root Canal Sealers. *BioMed Research International* **2016**, 9808432. ISSN: 2314-6133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206425/> (2021) (2016).

257. Siboni, F., Taddei, P., Zamparini, F., Prati, C. & Gandolfi, M. G. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. eng. International endodontic journal **50 Suppl 2**. Place: England, e120–e136. ISSN: 1365-2591 0143-2885 (Dec. 2017).
258. İnce Yusufoglu, S., Akman, M., Akbulut, M. B. & Eldeniz, A. Ü. Fracture resistance of roots enlarged with various rotary systems and obturated with different sealers. eng. Journal of dental research, dental clinics, dental prospects **13**, 215–220. ISSN: 2008-210X 2008-2118 2008-210X (2019).
259. Uzunoglu Ozyurek, E. & Aktemur Turker, S. Evaluation of fracture resistance of roots-filled with various root canal sealers at different time periods. eng. European oral research **53**, 6–11. ISSN: 2651-2823 2630-6158 2651-2823 (Jan. 2019).
260. Dimitrova-Nakov, S. et al. In vitro bioactivity of Bio-root™ RCS, via A4 mouse pulpal stem cells. eng. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials **31**. Place: England, 1290–1297. ISSN: 1879-0097 0109-5641 (Nov. 2015).
261. Vouzara, T., Dimosiari, G., Koulaouzidou, E. A. & Economides, N. Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer. eng. Journal of endodontics **44**. Place: United States, 849–852. ISSN: 1878-3554 0099-2399 (May 2018).
262. Poggio, C., Riva, P., Chiesa, M., Colombo, M. & Pietrocola, G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. eng. Journal of clinical and experimental dentistry **9**, e574–e578. ISSN: 1989-5488 1989-5488 1989-5488 (Apr. 2017).
263. Alsubait, S. A. et al. Cytotoxicity of Different Concentrations of Three Root Canal Sealers on Human Mesenchymal Stem Cells. Biomolecules **8**, 68. ISSN: 2218-273X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165276/> (2021) (Aug. 2018).
264. Jung, S. et al. Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. eng. PloS one **13**, e0194467. ISSN: 1932-6203 1932-6203 (2018).
265. Jung, S. et al. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers on human periodontal ligament cells ex vivo. eng. Odontology **107**. Place: Japan, 54–63. ISSN: 1618-1255 1618-1247 (Jan. 2019).
266. Camps, J., Jeanneau, C., El Ayachi, I., Laurent, P. & About, I. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. eng. Journal of endodontics **41**. Place: United States, 1469–1473. ISSN: 1878-3554 0099-2399 (Sept. 2015).
267. Collado-González, M. et al. Biocompatibility of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells. eng. International endodontic journal **50**. Place: England, 875–884. ISSN: 1365-2591 0143-2885 (Sept. 2017).
268. Lin, Q. et al. The in vivo dissolution of tricalcium silicate bone cement. eng. Journal of Biomedical Materials Research. Part A **109**, 2527–2535. ISSN: 1552-4965 (Dec. 2021).

269. Ali, M. R. W., Mustafa, M., Bårdsen, A. & Bletsa, A. Tricalcium silicate cements: osteogenic and angiogenic responses of human bone marrow stem cells. eng. European Journal of Oral Sciences **127**, 261–268. ISSN: 1600-0722 (June 2019).
270. Gaudin, A., Tolar, M. & Peters, O. A. Cytokine Production and Cytotoxicity of Calcium Silicate-based Sealers in 2- and 3-dimensional Cell Culture Models. eng. Journal of endodontics **46**. Place: United States, 818–826. ISSN: 1878-3554 0099-2399 (June 2020).
271. Jeanneau, C., Giraud, T., Laurent, P. & About, I. BioRoot RCS Extracts Modulate the Early Mechanisms of Periodontal Inflammation and Regeneration. eng. Journal of endodontics **45**. Place: United States, 1016–1023. ISSN: 1878-3554 0099-2399 (Aug. 2019).
272. Kebudi Benezra, M., Schembri Wismayer, P. & Camilleri, J. Influence of environment on testing of hydraulic sealers. en. Scientific Reports **7**. Bandiera_abtest: a Cc_license_type: cc_by Cg_type: Nature Research Journals Number: 1 Primary_atype: Research Publisher: Nature Publishing Group Subject_term: Biomaterials – cells;Biomedical materials;Preclinical research Subject_term_id: biomaterials-cells;biomedical-materials;pre-clinical-studies, 17927. ISSN: 2045-2322. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17280-7> (2021) (Dec. 2017).
273. Elyassi, Y., Moinzadeh, A. T. & Kleverlaan, C. J. Characterization of Leachates from 6 Root Canal Sealers. eng. Journal of Endodontics **45**, 623–627. ISSN: 1878-3554 (May 2019).
274. Urban, K., Neuhaus, J., Donnermeyer, D., Schäfer, E. & Dammaschke, T. Solubility and pH Value of 3 Different Root Canal Sealers: A Long-term Investigation. eng. Journal of endodontics **44**. Place: United States, 1736–1740. ISSN: 1878-3554 0099-2399 (Nov. 2018).
275. Zhao, W., Wang, J., Zhai, W., Wang, Z. & Chang, J. The self-setting properties and in vitro bioactivity of tricalcium silicate. eng. Biomaterials **26**, 6113–6121. ISSN: 0142-9612 (Nov. 2005).
276. Giraud, J. Y. et al. Bone cutting. eng. Clinical Physics and Physiological Measurement: An Official **12**, 1–19. ISSN: 0143-0815 (Feb. 1991).
277. Hilton, P. A. In the beginning. International Congress on Applications of Lasers & Electro- **2002**. Publisher: Laser Institute of America, 171727. <https://lia.scitation.org/doi/abs/10.2351/1.5066210> (2022) (Oct. 2002).
278. Houldcroft, P. & Sullivan, A. Gas-jet laser cutting. British Welding Journal (1967).
279. Bod, D., Brasier, R. & Parks, J. A powerful CO2 cutting tool. Laser Focus **5**, 36–38 (1969).
280. Chichkov, B. N., Momma, C., Nolte, S., von Alvensleben, F. & Tünnermann, A. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. en. Applied Physics A **63**, 109–115. ISSN: 1432-0630. <https://doi.org/10.1007/BF01567637> (2022) (Aug. 1996).

281. Knowles, M. R. H., Rutterford, G., Karnakis, D. & Ferguson, A. Micro-machining of metals, ceramics and polymers using nanosecond lasers. en. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology **33**, 95–102. ISSN: 1433-3015. <https://doi.org/10.1007/s00170-007-0967-2> (2022) (May 2007).
282. Khalkhal, E., Rezaei-Tavirani, M., Zali, M. R. & Akbari, Z. The Evaluation of Laser Application in Surgery: A Review Article. Journal of Lasers in Medical Sciences **10**, S104–S111. ISSN: 2008-9783. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6983859/> (2022) (2019).
283. Choy, D. S. History of lasers in medicine. eng. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon **36 Suppl 2**, 114–117. ISSN: 0171-6425 (June 1988).
284. Koester, C., Snitzer, E., Campbell, C. & Rittler, M. Experimental laser retina coagulator. J. Opt. Soc. Amer. **52**, 607 (1962).
285. Naresh & Khatak, P. Laser cutting technique: A literature review. en. Materials Today: Proceedings. 3rd International Conference on Contemporary Advances in Mechanical Engineering **56**, 2484–2489. ISSN: 2214-7853. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785321056947> (2022) (Jan. 2022).
286. Hibst, R. & Keller, U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. en. Lasers in Surgery and Medicine **9**. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/lsm.1900090405>, 338–344. ISSN: 1096-9101. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lsm.1900090405> (2022) (1989).
287. Walsh Jr., J. T. & Deutsch, T. F. Er:YAG laser ablation of tissue: Measurement of ablation rates. en. Lasers in Surgery and Medicine **9**. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/lsm.1900090404>, 327–337. ISSN: 1096-9101. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lsm.1900090404> (2022) (1989).
288. Kumar, V., Verma, R., Kango, S. & Sharma, V. S. Recent progresses and applications in laser-based surface texturing systems. en. Materials Today Communications **26**, 101736. ISSN: 2352-4928. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352492820327471> (2022) (Mar. 2021).
289. Obilor, A. F., Pacella, M., Wilson, A. & Silberschmidt, V. V. Micro-texturing of polymer surfaces using lasers: a review. en. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology. ISSN: 1433-3015. <https://doi.org/10.1007/s00170-022-08731-1> (2022) (Feb. 2022).
290. Nemickas, G., Kontenis, G., Žemaitis, A. & Čereška, D. Femtosecond laser texturing of surfaces: applications in industrial scale production in SPIE Photonics West Industry Events (SPIE, Online Only, United States, Mar. 2021), 11. ISBN: 978-1-5106-4371-0. <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/11768/2593542/Femtosecond-laser->

- texturing-of-surfaces--applications-in-industrial-scale/10.1117/12.2593542.full (2022).
291. Shivakoti, I., Kibria, G., Cep, R., Pradhan, B. B. & Sharma, A. Laser Surface Texturing for Biomedical Applications: A Review. en. Coatings **11**. Number: 2 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 124. ISSN: 2079-6412. <https://www.mdpi.com/2079-6412/11/2/124> (2022) (Feb. 2021).
 292. Sirdeshmukh, N. & Dongre, G. Laser micro & nano surface texturing for enhancing osseointegration and antimicrobial effect of biomaterials: A review. en. Materials Today: Proceedings. International Conference on Materials, Processing & Characterization **44**, 2348–2355. ISSN: 2214-7853. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785320401506> (2022) (Jan. 2021).
 293. Barfeie, A., Wilson, J. & Rees, J. Implant surface characteristics and their effect on osseointegration. eng. British Dental Journal **218**, E9. ISSN: 1476-5373 (Mar. 2015).
 294. Kang, C.-W. & Fang, F.-Z. State of the art of bioimplants manufacturing: part II. en. Advances in Manufacturing **6**, 137–154. ISSN: 2195-3597. <https://doi.org/10.1007/s40436-018-0218-9> (2022) (June 2018).
 295. West-Livingston, L. N., Park, J., Lee, S. J., Atala, A. & Yoo, J. J. The Role of the Microenvironment in Controlling the Fate of Bioprinted Stem Cells. Chemical Reviews **120**. Publisher: American Chemical Society, 11056–11092. ISSN: 0009-2665. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00126> (2021) (Oct. 2020).
 296. Muck, M. et al. Femtosecond Laser-Processing of Pre-Anodized Ti-Based Bone Implants for Cell-Repellent Functionalization. en. Nanomaterials **11**. Number: 5 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1342. ISSN: 2079-4991. <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/5/1342> (2022) (May 2021).
 297. Liu, Y., Rath, B., Tingart, M. & Eschweiler, J. Role of implants surface modification in osseointegration: A systematic review. en. Journal of Biomedical Materials Research Part A **108**. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.a.36829>, 470–484. ISSN: 1552-4965. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.36829> (2022) (2020).
 298. Paital, S. R. & Dahotre, N. B. Wettability and kinetics of hydroxyapatite precipitation on a laser-textured Ca-P bioceramic coating. eng. Acta Biomaterialia **5**, 2763–2772. ISSN: 1878-7568 (Sept. 2009).
 299. Costil, S. et al. Laser-Induced Surface Texturing of Metal or Organic Substrates for Structural Adhesive Bonding. en. Materials Science Forum **879**. Conference Name: THERMEC 2016 ISBN: 9783035711295 Publisher: Trans Tech Publications Ltd, 390–395. ISSN: 1662-9752. <https://www.scientific.net/MSF.879.390> (2022) (2017).

300. Baino, F., Montealegre, M. A., Minguella-Canela, J. & Vitale-Brovarone, C. Laser Surface Texturing of Alumina/Zirconia Composite Ceramics for Potential Use in Hip Joint Prosthesis. en. Coatings **9**. Number: 6 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 369. ISSN: 2079-6412. <https://www.mdpi.com/2079-6412/9/6/369> (2022) (June 2019).
301. Daskalova, A. et al. Ultra-fast laser surface texturing of β -tricalcium phosphate (β -TCP) ceramics for bone-tissue engineering applications. en. Journal of Physics: Conference Series **1492**. Publisher: IOP Publishing, 012059. ISSN: 1742-6596. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1492/1/012059> (2022) (Apr. 2020).
302. Lasgorceix, M. et al. Micropatterning of beta tricalcium phosphate bioceramic surfaces, by femtosecond laser, for bone marrow stem cells behavior assessment. en. Materials Science and Engineering: C **95**, 371–380. ISSN: 0928-4931. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117301613> (2021) (Feb. 2019).
303. Olsson, R. et al. Production of osseointegrating (bone bonding) surfaces on titanium screws by laser melt disruption. Journal of Laser Applications **30**. Publisher: Laser Institute of America, 042009. ISSN: 1042-346X. <https://lia.scitation.org/doi/abs/10.2351/1.5078502> (2022) (Nov. 2018).
304. Man, H. C., Chiu, K. Y. & Guo, X. Laser surface micro-drilling and texturing of metals for improvement of adhesion joint strength. en. Applied Surface Science **256**, 3166–3169. ISSN: 0169-4332. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433209017085> (2022) (Mar. 2010).
305. Coathup, M. J. et al. Controlled laser texturing of titanium results in reliable osteointegration. eng. Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society **35**, 820–828. ISSN: 1554-527X (Apr. 2017).
306. Ulerich, J. P., Ionescu, L. C., Chen, J., Soboyejo, W. O. & Arnold, C. B. Modifications of Ti-6Al-4V surfaces by direct-write laser machining of linear grooves in Photon Processing in Microelectronics and Photonics VI **6458** (SPIE, Mar. 2007), 307–316. <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/6458/645819/Modifications-of-Ti-6Al-4V-surfaces-by-direct-write-laser/10.1117/12.713964.full> (2022).
307. Nuutinen, T., Silvennoinen, M., Päiväsaari, K. & Vahimaa, P. Control of cultured human cells with femtosecond laser ablated patterns on steel and plastic surfaces. en. Biomedical Microdevices **15**, 279–288. ISSN: 1572-8781. <https://doi.org/10.1007/s10544-012-9726-8> (2022) (Apr. 2013).
308. Hallgren, C., Reimers, H., Chakarov, D., Gold, J. & Wennerberg, A. An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. eng. Biomaterials **24**, 701–710. ISSN: 0142-9612 (Feb. 2003).

309. Kang, J., Fan, W., Deng, Q., He, H. & Huang, F. Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source for Stem Cell-Based Therapy. BioMed Research International **2019**, 6104738. ISSN: 2314-6133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6374798/> (2022) (Jan. 2019).
310. Hilkens, P. et al. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. eng. Stem Cell Research **12**, 778–790. ISSN: 1876-7753 (May 2014).
311. Kim, B.-C. et al. Engineering three dimensional micro nerve tissue using postnatal stem cells from human dental apical papilla. eng. Biotechnology and Bioengineering **114**, 903–914. ISSN: 1097-0290 (Apr. 2017).
312. Kolar, M. K. et al. The neurotrophic effects of different human dental mesenchymal stem cells. en. Scientific Reports **7**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 12605. ISSN: 2045-2322. <http://www.nature.com/articles/s41598-017-12969-1> (2022) (Oct. 2017).
313. De Berdt, P. et al. Dental Apical Papilla as Therapy for Spinal Cord Injury. eng. Journal of Dental Research **94**, 1575–1581. ISSN: 1544-0591 (Nov. 2015).
314. Ding, G. et al. Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. eng. Cells, Tissues, Organs **191**, 357–364. ISSN: 1422-6421 (2010).
315. Lim, J., Lee, J., Yun, H.-S., Shin, H.-I. & Park, E. K. Comparison of bone regeneration rate in flat and long bone defects: Calvarial and tibial bone. en. Tissue Engineering and Regenerative Medicine **10**, 336–340. ISSN: 2212-5469. <https://doi.org/10.1007/s13770-013-1094-9> (2022) (Dec. 2013).
316. Garcia, P. et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. eng. European Cells & Materials **26**, 1–12, discussion 12–14. ISSN: 1473-2262 (July 2013).
317. Rapp, A. E. et al. Fracture Healing Is Delayed in Immunodeficient NOD/scid-IL2R α Mice. PLoS ONE **11**, e0147465. ISSN: 1932-6203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4744061/> (2022) (Feb. 2016).
318. Moazen, M., Peskett, E., Babbs, C., Pauws, E. & Fagan, M. J. Mechanical Properties of Calvarial Bones in a Mouse Model for Craniosynostosis. PLoS ONE **10**, e0125757. ISSN: 1932-6203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4429024/> (2022) (May 2015).
319. Lupu-Haber, Y. et al. Functionalized PLGA-doped zirconium oxide ceramics for bone tissue regeneration. en. Biomedical Microdevices **15**, 1055–1066. ISSN: 1572-8781. <https://doi.org/10.1007/s10544-013-9797-1> (2021) (Dec. 2013).
320. Chen, Y., Roohani-Esfahani, S.-I., Lu, Z., Zreiqat, H. & Dunstan, C. R. Zirconium Ions Up-Regulate the BMP/SMAD Signaling Pathway and Promote the Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts. en. PLOS ONE **10**. Publisher: Public Library of Science, e0113426. ISSN: 1932-6203. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113426> (2021) (Jan. 2015).
321. Chen, M. et al. Skeleton-vasculature chain reaction: a novel insight into the mystery of homeostasis. en. Bone Research **9**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 1–20. ISSN: 2095-6231. <http://www.nature.com/articles/s41413-021-00138-0> (2022) (Mar. 2021).

322. Fu, R. *et al.* Endothelial ZEB1 promotes angiogenesis-dependent bone formation and reverses osteoporosis. *eng. Nature Communications* **11**, 460. ISSN: 2041-1723 (Jan. 2020).
323. Liu, W. *et al.* Magnesium promotes bone formation and angiogenesis by enhancing MC3T3-E1 secretion of PDGF-BB. *eng. Biochemical and Biophysical Research Communications* **528**, 664–670. ISSN: 1090-2104 (Aug. 2020).
324. Solheim, E. Growth factors in bone. *International Orthopaedics* **22**, 410–416. ISSN: 0341-2695. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3619673/> (2022) (Dec. 1998).
325. James, A. W. *et al.* A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* **22**, 284–297. ISSN: 1937-3368. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4964756/> (2022) (Aug. 2016).
326. Von Euw, S. *et al.* Bone mineral: new insights into its chemical composition. *en. Scientific Reports* **9**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 8456. ISSN: 2045-2322. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-44620-6> (2022) (June 2019).
327. Roohani, I., Cheong, S. & Wang, A. How to build a bone? - Hydroxyapatite or Posner's clusters as bone minerals. *en. Open Ceramics* **6**, 100092. ISSN: 2666-5395. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666539521000389> (2022) (June 2021).
328. Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L. & Weiner, S. Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**. Publisher: Proceedings of the National Academy of Sciences, 12748–12753. <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0803354105> (2022) (Sept. 2008).
329. Sani, A., Cao, C. & Cui, D. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* **26**, 100991. ISSN: 2405-5808. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8063742/> (2022) (Apr. 2021).
330. Tsai, S.-W. *et al.* Internalized Gold Nanoparticles Do Not Affect the Osteogenesis and Apoptosis of MG63 Osteoblast-Like Cells: A Quantitative, In Vitro Study. *PLoS ONE* **8**, e76545. ISSN: 1932-6203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3788727/> (2022) (Oct. 2013).
331. Gu, Z., Fu, J., Lin, H. & He, Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *en. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **15**, 529–557. ISSN: 1818-0876. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087619311869> (2022) (Sept. 2020).
332. Menon, A., Póczos, B., Feinberg, A. W. & Washburn, N. R. Optimization of Silicone 3D Printing with Hierarchical Machine Learning. *3D Printing and Additive Manufacturing* **6**. Publisher: Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 181–189. ISSN: 2329-7662. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/3dp.2018.0088> (2022) (Aug. 2019).

333. Freeman, S., Calabro, S., Williams, R., Jin, S. & Ye, K. Bioink Formulation and Machine Learning-Empowered Bioprinting Optimization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **10**, 913579. ISSN: 2296-4185. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9240914/> (2022) (June 2022).
334. Lee, J., Oh, S. J., An, S. H., Kim, W.-D. & Kim, S.-H. Machine learning-based design strategy for 3D printable bioink: elastic modulus and yield stress determine printability. en. *Biofabrication* **12**. Publisher: IOP Publishing, 035018. ISSN: 1758-5090. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab8707> (2022) (May 2020).
335. Ren, Y. et al. Developments and Opportunities for 3D Bioprinted Organoids. eng. *International Journal of Bioprinting* **7**, 364. ISSN: 2424-8002 (2021).
336. Shimohira, T. et al. Comprehensive and Sequential Gene Expression Analysis of Bone Healing Process Following Er:YAG Laser Ablation. eng. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery* **39**, 100–112. ISSN: 2578-5478 (Feb. 2021).
337. Ohsugi, Y. et al. Evaluation of bone healing following Er:YAG laser ablation in rat calvaria compared with bur drilling. en. *Journal of Biophotonics* **12**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbio.201800245>, e201800245. ISSN: 1864-0648. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbio.201800245> (2022) (2019).
338. Troedhan, A. et al. Cutting bone with drills, burs, lasers and piezotomes: A comprehensive systematic review and recommendations for the clinician. en. *International Journal of Oral and Craniofacial Science* **3**, 020–033. ISSN: 2455-4634. <https://www.peertechzpublications.com/articles/IJOCS-3-128.php> (2022) (Aug. 2017).
339. Zhou, Y. The Application of Ultrasound in 3D Bio-Printing. eng. *Molecules (Basel, Switzerland)* **21**, E590. ISSN: 1420-3049 (May 2016).
340. Chansoria, P. & Shirwaiker, R. Characterizing the Process Physics of Ultrasound-Assisted Bioprinting. en. *Scientific Reports* **9**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 13889. ISSN: 2045-2322. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-50449-w> (2022) (Sept. 2019).
341. Morales, M., Munoz-Martin, D., Marquez, A., Lauzurica, S. & Molpeceres, C. en. in *Advances in Laser Materials Processing (Second Edition)* (ed Lawrence, J.) 339–379 (Woodhead Publishing, Jan. 2018). ISBN: 978-0-08-101252-9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081012529000133> (2022).
342. Emmert-Buck, M. R. et al. Laser capture microdissection. eng. *Science (New York, N.Y.)* **274**, 998–1001. ISSN: 0036-8075 (Nov. 1996).
343. Cheptsov, V. S. et al. Laser printing of microbial systems: effect of absorbing metal film. eng. *Letters in Applied Microbiology* **67**, 544–549. ISSN: 1472-765X (Dec. 2018).