Développement d'une matrice à base d'Elastin-like polypeptides (ELPs) pour favoriser la néoformation osseuse

Nadia Mahmoudi

▶ **To cite this version:**

Nadia Mahmoudi. Développement d'une matrice à base d'Elastin-like polypeptides (ELPs) pour favoriser la néoformation osseuse. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0048 . tel-04496894

HAL Id: tel-04496894
https://theses.hal.science/tel-04496894

Submitted on 9 Mar 2024

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.

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ Chimie et Technologies pour le vivant

Par Nadia MAHMOUDI

Développement d'une matrice à base d'Elastin-like polypeptides (ELPs) pour favoriser la néoformation osseuse.

Sous la direction de : Bertrand GARBAY et Joëlle AMÉDÉE-VILAMITJANA.

Soutenue le 7 Mars 2023

Membres du jury :

M. EGLIN David, PU	École des Mines de Saint-Etienne	Rapporteur
M. SUBRA Gilles, PU	Université de Montpellier	Rapporteur
Mme. LOGEART-AVRAMOGLOU Delphine, DR	CNRS, Paris cité	Présidente du jury
Mme. GARANGER Élisabeth, CR	CNRS, LCPO, Bordeaux	Examinatrice
M. GARBAY Bertrand, PU	INP, LCPO, Bordeaux	Directeur de thèse
Mme. AMÉDÉE-VILAMITJANA Joëlle, DR	Inserm, BIOTIS, Bordeaux	Directrice de thèse
M. PAIVA DOS SANTOS Bruno, MCF	URP2496, Université Paris Cité	Invité

Développement d'une matrice à base d'Elastin-like polypeptides (ELPs) pour favoriser la néoformation osseuse.

Résumé : La reconstruction de segments osseux, comme cela peut être nécessaire dans les cas de traumatismes sévères de grands volumes, suite à une chirurgie réparatrice ou exèrese d'un ostéosarcome, demeure un défi à résoudre. L'approche clinique actuelle repose sur la greffe autologue de tissus osseux. Cette approche est efficace mais souvent limitée par la quantité de tissus pouvant être prélevée chez le patient. C'est pourquoi les cliniciens se sont tournés vers l'utilisation de matrices synthétiques ou naturelles comme support à la régénération osseuse. Néanmoins, l'efficacité de ces matériaux est limitée dans le cas des défauts osseux de grande taille. Dans ce contexte, notre objectif a été de développer un nouveau biomatériau, de type hydrogel, qui permette non seulement la colonisation par les cellules ostéogéniques, mais qui offre également un microenvironnement favorable à l'angiogenèse et à la neurogenèse, deux processus essentiels à la régénération osseuse complète.
L'hydrogel est formé par des « Elastin-like polypeptides » (ELPs), qui sont des polymères recombinants produits chez la bactérie *Escherichia coli*. Les ELPs utilisés dans cette étude contiennent des résidus méthionine modifiés chimiquement par une réaction de thioalkylation pour introduire des fonctions alcènes. Ces fonctions sont nécessaires à la réticulation par chimie thiol-ène avec deux peptides bioactifs présentant des résidus cystéine aux extrémités C- et N-terminales. Le premier peptide est capable d'augmenter le recrutement des cellules vasculaires et neuronales (IKVAV et YIGSR). Le second a un rôle dans la rétention du phosphate de calcium (SNA15). Différentes concentrations de particules d'hydroxyapatite (HA), un composant minéral connu pour ses propriétés ostéo-(in)(con)ductives, ont été ajoutées aux hydrogels protéiques.
Pour évaluer le potentiel de minéralisation, les hydrogels présentant les meilleures caractéristiques ont été implantés par voie sous-cutanée chez des souris afin de choisir la concentration de HA. Ils ont été suivis longitudinalement après 2 et 4 semaines d'implantation par microtomographie aux rayons X (micro-CT).
Les gels ainsi que les tissus environnants associés ont été explantés pour des analyses histologiques. La formation de tissu ostéoïde a été visualisée par une coloration au trichrome de Masson afin de distinguer le tissu osseux néoformé du collagène synthétisé par les cellules. La formation de structures vasculaires et neuronales, la présence de cellules osseuses, ainsi que l'inflammation ont été évaluées par immunohistofluorescence avec des marqueurs vasculaires (Endomucine, Meca32, Podocalyxin), neuronaux (β III tubuline), et osseux (Osteocalcine).
La matrice présentant les meilleurs résultats en termes de minéralisation, d'angiogenèse, de colonisation cellulaire et d'innervation a été implantée dans un défaut de condyle osseux (os long) ainsi que dans un défaut mandibulaire (os plat) chez le rat.

Mots clés : Elastin-like polypeptides, Biomatériaux, Réparation osseuse.

Development of a matrix based on Elastin-like polypeptides (ELP) to promote bone neoformation.

Abstract : The reconstruction of large bone segments, as may be necessary in cases of severe trauma osteosarcoma and reconstructive surgery, remains a challenge to be solved. The current clinical approach is based on autologous bone tissue transplantation. This approach is effective but often limited by the amount of tissue that can be removed from the patient. This is why clinicians have turned to the use of synthetic or natural matrices as a support for bone regeneration. However, the effectiveness of these materials is limited in the case of large bone defects.
Our objective was to develop a new biomaterial, of the hydrogel type, which not only allows colonization by osteogenic cells, but which also offers a suitable microenvironment for angiogenesis and neurogenesis which are two essential processes for completing bone regeneration.
The hydrogel is formed by "Elastin-like polypeptides" (ELPs), which are recombinant polymers produced in the bacterium Escherichia coli. The ELPs used in this study contain methionine residues chemoselectively modified by a thioalkylation reaction to introduce alkene functions allowing subsequent cross-linking with two bioactive peptides containing cysteine residues at the C- and N-termini. The first is able to increase the recruitment of vascular and neuronal cells (IKVAV and YIGSR). The second has a role in the retention of calcium phosphate (SNA15). Different concentrations of hydroxyapatite (HA) particles, a mineral component known for its osteo-(in)(con)ductive properties, were added to the ELPs based hydrogels.
To assess the potential for mineralization, the hydrogels with the best characteristics were implanted subcutaneously in mice to select the optimized concentration of HA. They were followed longitudinally after 2 and 4 weeks of implantation by X-ray micro computed tomography (micro-CT).
The gels as well as the associated surrounding tissues were explanted for histological analyses. The formation of osteoid tissue was visualized by Masson's trichrome staining in order to distinguish the newly formed bone tissue from the collagen tissue synthesized by the cells. The formation of vascular and neuronal structures, the presence of bone cells, as well as inflammation were provided by immunofluorescence of vascular (Endomucin, Meca32, Podocalyxin), neuronal (β III tubulin), and bone (Osteocalcin) markers.
The matrix showing the best results in terms of mineralization, angiogenesis, cell colonization and innervation was thereafter implanted in a condylar bone defect in rats (long bone) as well as in a mandibular defect (flat bone).

Keywords : Elastin-like polypeptides, Biomaterials, Bone repair.

UNITÉS DE RECHERCHE

Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO)
CNRS, UMR 5629 – 16 Avenue Pey Berland – 33400 Pessac

Bioingénierie Tissulaire (BioTis)
Université de Bordeaux, INSERM U1026 – 146, rue Léo Saignat – 33076 Bordeaux

À mes filles Assiya et Selma,

à mes parents Fatima et Abdeslam,

à mon tendre époux Omar.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, le Pr. David EGLIN et le Pr. Gilles SUBRA pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux de thèse. Je tiens également à remercier les Dr. Élisabeth GARANGER et Dr. Delphine LOGEART-AVRAMOGLOU d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie le programme SPARK et Science Aquitaine Transfert pour avoir financé mes travaux de thèse ainsi que l'Université de Bordeaux et le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) pour son financement à travers l'attribution de ma bourse doctorale.

Je souhaite remercier également Nicolas L'Heureux et Sébastien Lecommandoux pour leur accueil au sein des laboratoires BIOTIS et LCPO et pour m'avoir permis de mener à bien mon doctorat.

Je souhaite en premier lieu remercier mon directeur de thèse le Pr. Bertrand GARBAY avec qui le *feeling* est directement passé dès mon stage de fin d'étude. Merci pour m'avoir donné le goût de la Science, merci pour votre soutien, merci pour votre bienveillance, merci d'avoir cru en moi. Merci pour tout le temps accordé.

Merci à ma directrice Dr. Joëlle AMEDEE, je te remercie pour ta bonne humeur, ta bienveillance, ton soutien et ta volonté. Merci de m'avoir donné l'opportunité de participer à l'organisation d'un congrès tel que l'ESB. Bertrand et Joëlle, vous avez été un duo de choc, je n'aurais pu espérer meilleur encadrement. Je sais que je serais à jamais votre petite dernière, quant à vous, vous serez à jamais mes modèles.

Ces trois années de thèse n'ont pas été de tout repos avec la naissance de ma petite Selma. Merci à mon époux Omar pour ton soutien, merci de m'avoir secondé, merci d'avoir séché mes larmes et merci de m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Merci surtout de m'avoir remis les pieds sur terre et merci de m'aider à relativiser. Ma fille Assiya, ma merveille, merci d'être si sage et si aimante, un sourire de toi et la journée difficile s'envole. J'ai bien souvent été absente mais maman sera toujours là.

Merci à mes parents Fatima et Abdeslam, un million de merci ne seraient suffisant pour tous vos sacrifices, merci de m'avoir donné le goût de l'effort et merci d'avoir fait celle que je suis aujourd'hui. Infiniment merci à ma petite sœur Soumia, merci pour toutes ces répétions, merci pour les corrections

en anglais, merci de t'être occupée de mes princesses quand j'étais épuisée, je sais qu'on ne se dit pas ce genre de chose mais merci d'être toi.

Cette thèse a commencé au LCPO avec Pedro, Pierre, Megi, Anouk et Diana. Merci pour tous ces fous rires, merci de tout le temps que vous m'avez consacré, à toutes vos explications, merci de votre soutien. Merci à Manon, Marie et Élisabeth de m'avoir initié à la Chimie des polymères.

Merci à Bruno de m'avoir formé à (quasi) tout, merci pour ta joie et ta bonne humeur. Merci à Alice de m'avoir aidé à surmonter ma peur des rongeurs, ça a été un plaisir d'avoir travaillé à tes côtés. Merci à Micaela d'avoir illuminé cette dernière année de thèse, merci pour tes sourires et merci pour ta force de travail. Tu es un rayon de soleil, merci de m'avoir tant de fois remonté le moral et merci pour mon état psychique. Merci à Camille, merci pour toutes les discussions, merci pour mon moral, merci de m'avoir secondé quand je n'avais plus le pouvoir de me dédoubler.

Merci à toute la team BIOTIS pour ces deux merveilleuses années. Merci à Mathilde de m'avoir entraîné dans *Dance your PhD* (et bravo pour le prix), merci de m'avoir donné l'opportunité de faire des choses dont je me sentais incapable. Merci à Nicolas et Quentin pour les fous rires que vous m'avez apporté. Merci à Naïma/Nahima/Nayma pour les discussions sans fin du microCT. Merci à Théo, à Arvind, à Ghannaa, merci à Maude, à Diane, à Gaëtan, à Romane et à Adeline. Merci à Robin pour ta bonne ou ta mauvaise humeur, merci pour les discussions scientifiques. Merci à Hugo notre leader, merci de nous faire réfléchir et merci de donner cette âme à BIOTIS. Merci à Olivier pour la pertinence de tes remarques, merci du temps que tu m'as accordé.

Merci à Sylvie pour les centaines d'heures d'histologie, merci à Martine de l'avoir secondé. Merci à Gérald et Philippe pour la microscopie électronique. Merci à Sylvain et Mathilde F. pour les toutes les chirurgies.

Merci à mes amis pour ces moments de légèreté, merci à Julie, à Nesrine, à Médine, à tous les 3ajibeurs et 3ajibeuses. Merci à ma famille dans son entièreté. Merci à toutes les personnes qui ont croisé mon chemin que ça soit dans les labos, dans les congrès, au coin d'un café. Merci à tous mes anciens professeurs qui ont fait de moi la scientifique que je suis.

Sincèrement,

Amicalement,

Nadia.

Sommaire

Abréviations ____ *15*

Revue de la Littérature ____ *19*

I. L'os : structure et remodelage. ____ **20**

1.1. Le tissu osseux. ____ 22

1.1.1. Les cellules osseuses. ____ 22

1.1.2. La matrice extracellulaire minéralisée. ____ 24

1.2. Le tissu cartilagineux. ____ 26

1.3. Le tissu vasculaire dans l'os. ____ 27

1.3.1. Structure des vaisseaux sanguins. ____ 28

1.3.2. Organisation des vaisseaux sanguins dans l'os. ____ 29

1.3.3. Formation de nouveau vaisseaux sanguins et angiogenèse. ____ 31

1.4. Le tissu nerveux dans l'os. ____ 32

1.4.1. Généralités sur le système nerveux. ____ 32

1.4.1.1. Les cellules nerveuses. ____ 33

1.4.1.1.1. Les cellules neuronales périphériques. ____ 33

1.4.1.1.2. Les neurones. ____ 34

1.4.1.2. Transmission de l'information nerveuse. ____ 35

1.4.1.3. Lien entre développement de l'os et innervation. ____ 36

1.4.2. L'innervation de l'os. ____ 37

1.4.2.1. Les neurones sensoriels innervant les os. ____ 38

1.4.2.2. Les neurones autonomes sympathiques innervant les os. ____ 39

1.4.2.3. Localisation des nerfs dans l'os. ____ 39

1.5. Remodelage osseux physiologique. ____ 41

II. Stratégies de réparation osseuse. ____ **43**

2.1. Incidence des fractures osseuses. ____ 43

2.2. Réparation des fractures osseuses. ____ 44

2.2.1. Les fractures osseuses. ____ 44

2.2.2. Réparation des fractures en conditions physiologiques. ____ 44

2.2.2.1. La phase inflammatoire - hématome fracturaire. ____ 45

2.2.2.2. La phase du cal fibro-cartilagineux – formation de tissu ostéoïde. ____ 45

2.2.2.3. La phase du cal osseux dur. ____ 45

2.2.2.4. La phase de remodelage dans un os néoformé. ____ 46

2.2.3. Rôle de l'innervation dans la réparation des fractures. ____ 46

2.3. Cas des fractures non réparées. ____ 48

2.3.1. Pathologies associées à une réparation insuffisante des fractures. ____ 48

2.3.2. Inflammation chronique au site de fracture non réparé. ____ 49

III. Les substituts pour la réparation osseuse. ____ **51**

3.1. Les greffes osseuses. ____ 51

3.1.1. Les greffes osseuses autologues. ____ 51

3.1.2. Les greffes osseuses allogéniques. ____ 52

3.1.3. Les greffes osseuses xénogéniques. ____ 52

3.2. Les matériaux pour l'ingénierie du tissu osseux. ____ 53

3.2.1. Cahier des charges d'un biomatériau. ____ 54

3.2.2. Les matériaux utilisés en réparation osseuse. ____ 55

3.2.2.1. Les céramiques : exemple des apatites carbonatées. ____ 56

3.2.2.1.1. L'hydroxyapatite (HA). 57
3.2.2.1.2. Le phosphate de calcium tricalcique (TCP). 57
3.2.2.2. Les métaux. 58
3.2.2.3. Les polymères synthétiques. 59
3.2.2.4. Les polymères naturels. 59
3.2.2.5. Les matériaux composites et multi échelle. 60
3.2.2.5.1. Les hydrogels. 60
3.2.3. Mise en forme des matrices composites pour l'obtention de structures poreuses et interconnectées. 65
3.2.3.1. L'impression 3D. 66
3.2.3.2. « Freeze casting » et cryogels. 68
3.2.3.2.1. Principe. 68
3.2.3.2.2. Effet de la lyophilisation sur la structure des biomatériaux. 69
3.2.3.2.2. Modulation de la forme et de l'orientation des pores. 70

IV. Stratégies d'amélioration des propriétés des biomatériaux. 72
4.1. Facteurs de croissance. 73
4.1.1. Rôle des BMP et du FGF dans la formation osseuse. 74
4.1.2. Rôle du VEGF dans l'angiogenèse. 75
4.1.3. Rôle de la semaphorine 3A dans l'innervation. 75
4.2. Peptides bioactifs. 76
4.2.1. Les peptides d'adhésion cellulaire. 77
4.2.1.1. Le motif RGD. 77
4.2.1.2. Les motifs IKVAV et YIGSR. 78
4.2.1.2.1. Le peptide IKVAV. 79
4.2.1.2.1. Le peptide YIGSR. 80
4.2.2. Sites de dégradation reconnus par les métalloprotéinases (MMPs). 80
4.2.3. Les peptides de nucléation du phosphate de calcium. 82

V. Les polypeptides dérivés de l'élastine (ELPs) pour l'ingénierie tissulaire. 85
5.1. L'élastine naturelle. 85
5.1.1. Généralités sur l'élastine. 85
5.1.2. Synthèse de l'élastine et élastogenèse. 85
5.2. Généralités sur les ELPs. 86
5.2.1. Propriétés et structure des ELPs. 87
5.2.1.1. Propriétés des ELPs. 87
5.2.1.2. Structure des ELPs. 88
5.3. Synthèse des ELPs. 89
5.3.1. Synthèse des gènes d'ELPs. 89
5.3.2. Concaténérisation. 90
5.3.3. Ligature directionnelle récursive (RDL). 90
5.4. Purification des ELPs par cycle de transition inverse (ITC). 91
5.5. Immunogénicité des ELPs. 92
5.6. Modifications chimiosélectives des acides aminés des ELPs. 94
5.6.1. Modification de l'extrémité N-terminale et de la lysine. 94
5.6.2. Modification de la chaîne latérale d'un acide aminé dans la séquence. 95
5.6.2.1. La cystéine. 95
5.6.2.2. Le tryptophane et la tyrosine. 95
5.6.2.3. La méthionine. 96
5.7. Les ELPs en ingénierie tissulaire. 97
5.7.1. Les ELPs pour la réparation du cartilage. 98
5.7.2. Les ELPs en ingénierie tissulaire oculaire. 99
5.7.3. Les ELPs pour les greffes vasculaires. 99
5.7.4. Les ELPs en ingénierie tissulaire osseuse. 100

Objectifs de la Thèse 105

Résultats 111

Chapitre 1 : Production recombinante, post-modifications chimiques et caractérisation du polypeptide d'élastine. 112

I. Introduction 113

II. Matériels et méthodes. 114

1.1. Conception de la séquence codant l'ELP M80 et clonage. 114

1.1.1. Ligature directionnelle récursive (RDL) dans le vecteur de clonage pUC19 et obtention du vecteur de clonage pUC19-ELP M80. 114

Obtention du vecteur de clonage pUC19-ELP M80. 115

Ligation de l'insert M20 dans le vecteur pUC19-ELP M60. 115

Transformation des bactéries compétentes Stellar par le plasmide pUC19-ELP M80. 115

1.1.2. Sous clonage de la séquence codant l'ELP M80 dans le vecteur d'expression pET44. 116

Isolement et purification du plasmide pET44 et de l'insert codant l'ELP M80. 116

Clonage dans le vecteur d'expression pET44 de la séquence codant l'ELP M80. 117

2.2. Production de l'ELP M80 par *Escherichia coli.* 117

2.3. Purification de l'ELP M80 par Cycle de Transition Inverse (ITC). 117

2.3.1. Récolte bactérienne et lyse cellulaire. 117

2.3.2. Purification de l'ELP M80 par « Inverse Transition Cycling » (ITC). 118

2.4. Modifications chimiosélectives des résidus de méthionine de l'ELP M80. 118

2.4.1. Modification des méthionines par réaction de Thioalkylation. 118

2.4.2. Déméthylation des méthionines préalablement thioalkylées. 119

2.5. Caractérisation des ELPs. 119

2.5.1. Mesure des températures de point trouble des ELPs. 119

2.5.2. Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^{1}H). 119

2.5.3. Caractérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC). 119

2.5.4. Caractérisation par Analyse Thermo-Gravimétrique (ATG). 120

2.5.5. Caractérisation par Spectrométrie de masse ESI-MS. 120

III. Résultats. 121

3.1. Synthèse des gènes codant de « nouveaux » ELP (M80 et M100). 121

3.2. Production et purification des polypeptides ELPs M80 et M100. 124

3.3. Caractérisation des ELPs. 127

3.3.1. Gel d'électrophorèse en condition dénaturantes. 127

3.3.2. Caractérisation de l'ELP M80. 128

3.3.2.1. Caractérisation par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. 128

3.3.3.2 Analyse de l'ELP M80 par chromatographie d'exclusion stérique. 129

3.3.2.2. Mesure des points de trouble (TCPs). 131

IV. Post-modifications chimiques des ELPs. 135

4.1. Addition d'un groupe alcène sur les méthionines de l'ELP M80 par réaction de thioalkylation. 135

4.2. Élimination du groupe méthyle de l'ELP M80-alcène par réaction de déméthylation. 138

4.3. Caractérisation de l'ELP M80 déméthylé. 139

4.3.1. SDS-PAGE. 139

4.3.2. RMN ^{1}H. 141

4.3.3. Détermination de la Tcp des ELPs d.M80-alcène. 142

V. Conclusion. 143

VI. Annexes. 144

Chapitre 2 : Production et caractérisation des matrices à base d'ELPs. *147*

I. Introduction. **148**

II. Matériels et méthodes. **150**

2.1. Préparation et analyse des particules d'hydroxyapatite (HA). 150

2.1.1. Synthèse de l'HA. 150

2.1.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR). 150

2.1.3. Analyse par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS). 150

2.2. Obtention des matrices à composites à base d'ELP M80. 150

2.2.1. Préparation des solutions. 150

2.2.2. Photo-réticulation des différentes matrices d'ELPs. 151

2.3. Caractérisation des matrices composites d'ELPs. 152

2.3.1. Tests rhéologiques. 152

Tests de déformation : détermination du domaine linéaire de viscoélasticité. 152

Tests de balayage en fréquence et en température. 152

2.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB). 153

MEB couplé à la microanalyse à rayons X dispersive en énergie (EDX). 153

Cryo-Microscopie Electronique à Balayage. 153

2.3.3. Interconnexion des pores. 153

2.4. Test de viabilité cellulaire et de cytotoxicité. 154

2.5. Analyses statistiques. 154

III. Formulation des hydrogels. **155**

3.1. Détermination des paramètres et formulation des hydrogels. 155

3.1.1. Choix du rapport molaire entre alcène et thiol. 155

3.1.1.1. Utilisation d'un Stratalinker à des fins de standardisation. 155

3.1.1.2. Choix du rapport molaire entre alcène et thiol. 156

3.1.2. Choix du polymère constitutif des hydrogels : ELP M80-alcène ou d.ELP M80-alcène. 157

3.1.2.1. Choix du polymère entre l'ELP M80-alcène et le d.ELP M80-alcène. 157

3.1.2.2. Analyses rhéologiques. 158

3.1.2.2.1. Tests de déformation. 158

3.1.2.2.2. Test de balayage en fréquence. 158

3.1.2.2.3. Tests de balayage en température. 160

3.1.2.2.4. Analyse de la cytotoxicité des hydrogels. 161

3.2. Synthèse des particules d'hydroxyapatite (HA) pour la formation des matrices composites. 162

3.2.1. Synthèse de particules d'HA. 162

3.2.2. Caractérisation physicochimique des particules d'HA. 163

3.3. Temps d'exposition sous UV et réticulation. 165

3.4. Choix de la concentration en ELP M80-alcène et en particules d'HA. 166

IV. Caractérisation des matrices de formulation finale. **170**

4.1. Porosité des matrices hydratées. 170

4.2. Interconnexion des pores. 171

4.3. Intérêt du peptide SNA15 dans la rétention et la distribution des particules d'hydroxyapatite. 172

V. Conclusion. **174**

VI. Annexes. **175**

Chapitre 3 : Évaluation in vitro de la matrice composite à base d'ELPs. ____ *177*

I. Introduction. ____ **178**

II. Matériels et méthodes. ____ **179**

2.1. Production des matrices. ____ 179
2.2. Isolement des cellules et cultures cellulaires. ____ 179
2.2.1. Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse de Rat (MSCs). ____ 179
2.2.2. Cellules endothéliales (ECs). ____ 180
2.2.3. Neurones sensoriels (NS) issus des ganglions de la racine dorsale de Rat (DRG). ____ 180
2.3. Test d'activité métabolique. ____ 181
2.4. Test de viabilité cellulaire et de cytotoxicité. ____ 182
2.5. Test d'activité de la phosphatase alcaline. ____ 182
2.6. Immunocytofluorescence des marqueurs des NS. ____ 182

III. Résultats et Discussion. ____ **183**

3.1. Activité métabolique et viabilité cellulaire des MSCs. ____ 183
3.2. Évaluation de l'activité de la phosphatase alcaline des MSCs. ____ 185
3.3. Prolifération des cellules endothéliales. ____ 187
3.4. Influence du peptide IKVAV/YIGSR sur le développement des neurites. ____ 190

IV. Conclusion. ____ **191**

Chapitre 4 : Évaluation in vivo des matrices composites à base d'ELPs en site ectopique et dans des lésions osseuses ____ *193*

I. Introduction. ____ **194**

II. Matériels et méthodes. ____ **195**

2.1. Implantations des matrices en sous-cutané. ____ 195
2.2. Implantations des matrices dans des défauts osseux. ____ 196
2.2.1. Le Collapat ® comme matériau contrôle. ____ 197
2.2.2. Modèle expérimental de lésion osseuse dans le condyle fémoral de rat. ____ 197
2.2.3. Modèle expérimental de lésion osseuse de taille critique dans la mandibule de rat. ____ 198
2.3. Suivi de la minéralisation par microtomographie aux rayons X (micro-CT). ____ 199
2.4. Analyses histologiques des matrices implantées. ____ 200
2.4.1. Colorations histologiques au Trichrome de Masson. ____ 200
2.4.1.1. Coloration au Trichrome de Masson. ____ 200
2.4.1.2. Quantification du tissu ostéoïde et collagénique néoformés. ____ 201
2.4.2. Analyse immunohistologique. ____ 202
2.4.2.1. Immunofluorescence des structures nerveuses et vasculaires. ____ 202
2.4.2.2. Immunofluorescence des cellules inflammatoires. ____ 202
2.5. Transparisation des tissus et mise en évidence des réseaux neuronaux et vasculaires. ____ 203
2.5.1. Immunomarquage en « whole-mount ». ____ 203
2.5.2. « Transparisation » des tissus. ____ 203
2.5.3. Acquisition et traitement des images. ____ 203
2.6. Analyses statistiques. ____ 204

III. Résultats des implantations en site ectopique des matrices ELPs supplémentées avec différentes concentrations de HA. ____ **205**

3.1. Potentiel de minéralisation des matrices composites ELPs. ____ 205
3.2. Étude des propriétés ostéoinductrices des matrices composites. ____ 206
3.2. Potentiel angiogénique et d'innervation des matrices ELP. ____ 208
3.3. Étude de la réaction inflammatoire après implantation sous-cutanée des matrices composites. 211
3.4. Étude *in vivo* du devenir de la matrice composite. ____ 212

IV. Implantation de la matrice composite en site osseux. _____ 213
4.1. Implantation dans le condyle fémoral de rat. _____ 213
4.1.1. Suivi de la minéralisation des matrices. _____ 213
4.1.2. Analyse histologique de la néoformation osseuse induite par les matrices composites. __ 215
4.1.3. Vascularisation et innervation des défauts condylaires. _____ 219
4.2. Implantation de la matrice composite dans un défaut mandibulaire. _____ 221
4.2.1. Potentiel de minéralisation._____ 221
4.2.2. Analyse histologique de la néoformation osseuse induite par les matrices composites. __ 222
V. Conclusion. _____ 224
VI. Annexes. _____ 225
Conclusions et Perspectives _____ ***227***
Communications et publications _____ ***240***
Bibliographie _____ ***242***

Abréviations

A

ACh : Acétylcholine

ACN : Acétonitrile

AcOH : Acide acétique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALP : Phosphatase Alcaline

ANOVA : « *ANalysis Of Variance* »

APDC : Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate

ATP : Adénosine TriPhosphate

B

BMU : « *Basic Multicellular Units* » unités multicellulaires osseuses

BMP : « *Bone Morphogenic Protein* », protéines morphogénétiques osseuses

BSA : « *Bovine Serum Albumin* »

BSP : « *Bone SialoProtein* », sialoprotéine osseuse

C

$CaCO_3$: Carbone calcique

CaP : Calcium Phosphate

CGRP : « *Calcitonin Gene-Related Peptide »*

Col I : Collagène de type I

CPP : Peptides de pénétration cellulaire

CS : « *Cold spin* », centrifugation à froid

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

D

DAD : Détecteur à réseau de diodes

DAPI : Di Aminido Phenyl Indol

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

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

DO : Densité Optique

DRG : « *Dorsal Root Ganglion »*

E

ECs : Cellules endothéliales

EDX : Microanalyse à rayons X dispersive en énergie

ELP : « *Elastin-Like Polypeptide* », Polypeptide de type élastine

EMCN : Endomucine

ESI-MS : « *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* »

F

FBS : Sérum de Veau Fœtal

FDA : « *Food and Drug Administration* », Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FGF : « *Fibrobast Growth Factor* »

FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

G

GF : « *Growth Factor* », facteur de croissance

H

HA : Hydroxyapatite

hBMSC : Cellules souches mésenchymateuses humaines issues de la moelle osseuse

HCP : « *Host Cell Proteins* »

HFIP : HexaFluoroIsoPropanol

HS : « *Hot spin* », centrifugation à chaud

I

Ihh : Indian hedgehog

IKVAV : Peptide dérivé de la laminine

IPTG : Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

ITC : Cycle de Transition Inverse

L

LepR : Récepteur de la leptine.

M

MALDI : Ionisation par désorption laser assistée par matrice

MALS : Détection de diffusion de la lumière multi-angles

MAPK : Protéine kinase activée par les mitogènes

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MeOH : Méthanol

MEPE : Phosphoglycoprotéine extracellulaire matricielle

$Mg(OH)_2$: Hydrogénure de magnésium

Micro-CT : Microtomographie aux rayons X à haute résolution

MMP : « *Matrix Metalloproteinase* »

MSC : « *Mesenchymal Stem Cell* », Cellule souche mésenchymateuse

N

NE : Noradrénaline

NF : Neurofilament

NGF : « *Nerve Growth Factor* »

nt : Neurotransmetteur

NPY : Neuropeptide Y

O

OCN : Ostéocalcine

OSN : Ostéonectine

OSP : Ostéopontine

OSX : Ostérix

P

PA : Potentiel d'action

PBS : Tampon phosphate salin

PCL : Polycaprolactone

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PDGF : « *Platelet-Derived Growth Factor* »

Pdi : Indice de polydispersité

PDMS : PolyDiMéthylSiloxane

PECAM : « *Platelet endothelial cell adhesion molecule* »

PEG : PolyÉthylène Glycol

PFA : ParaFormAldéhyde

PG : Prostaglandine

PHOSPHO1 : Phosphocholine Phosphatase 1

Pi : Phosphate inorganique

PLA : Acide Polylactique

PPi : Pyrophosphate

PS : Pénicilline Stréptomycine

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

PTM : Modifications Post-Traductionnelles

PU : Polyurethane

R

RDL : Ligature Directionnelle Récursive

ReACT : « *Redox-Activated Chemical Tagging* »

RFP : « *Red Fluorescent Protein* »

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

ROP : « *Ring Opening Polymerisation* »

Runx2 : « *Runt-related transcription factor 2* »

S

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium

SEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique

Sema3A : Sémaphorine 3A

SMC : Cellules musculaires lisses vasculaires

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SP : Substance P

T

TCP : Phosphate de calcium tricalcique

Tcp : Température de point de trouble

TGA : Analyse thermogravimétrique

TGF-β : Facteur de croissance transformant

TH : Tyrosine Hydroxylase

TM : Trichrome de Masson

TRAP : Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

TrkA : Récepteur de la tyrosine kinase neurotrophique de type 1

Tt : Température de transition

U

UV : Ultra-Violet

V

VEGF : « *Vascular Endothelial Growth Factor* »

VIP : « V*asoactive Intestinal Peptide »*

VSMC : « *Vascular Smooth Muscle Cells* »

Y

YIGSR : Peptide dérivé de la Laminine

Revue de la Littérature

I. L'os : structure et remodelage.

Le squelette humain est la charpente du corps qui le protège, le soutien et le maintien. Il est composé de 206 os, répartis entre le squelette axial et le squelette appendiculaire (Figure 1). Le squelette axial représente l'axe central de l'organisme (crâne, colonne vertébrale, cage thoracique et bassin) et a essentiellement un rôle de protection des organes internes. Le squelette appendiculaire est lui composé des os longs des membres, et des os courts des articulations.

Les os sont des organes composés de différents tissus, parmi lesquels le tissu osseux, le tissu cartilagineux, le tissu nerveux et les vaisseaux sanguins.

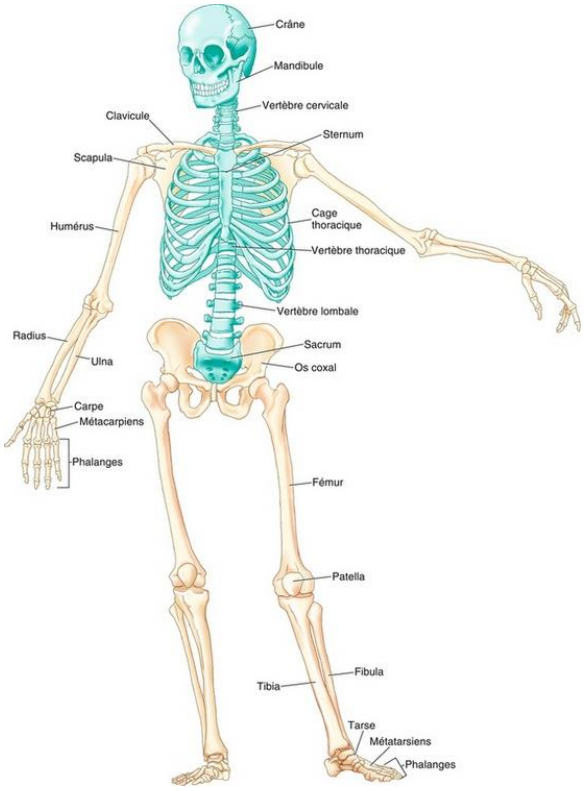


Figure 1 : Squelette humain (Benhamza 2019).

Le squelette axial (bleu) est distingué du squelette appendiculaire (beige). Ils ont respectivement un rôle dans la protection des organes et dans la locomotion.

La classification histologique distingue le tissu osseux primaire, qui est le premier tissu osseux formé et qui a vocation à être remplacé, du tissu osseux secondaire, qui est issu d'une ossification secondaire du tissu osseux primaire. Le tissu osseux primaire est de type fibreux. Le tissu osseux secondaire est quant à lui de type lamellaire, il est divisé en tissu osseux haversien compact ou cortical et en tissu osseux trabéculaire ou spongieux.

On peut également les classer selon leur morphologie, les os longs (fémur, tibia…) issus d'une ossification endochondrale avec ébauche cartilagineuse et les os plats (omoplate, crâne, mandibule) issus d'une ossification membranaire sans ébauche cartilagineuse.

Figure 2: Structure macroscopique d'un os long, adapté de Lm 2016.

Les os sont protégés par une enveloppe externe, le périoste. Deux types d'os sont présents : l'os spongieux et l'os compact. L'os spongieux est localisé dans la partie interne et est protégé par de l'os compact qui se trouve en périphérie. Le cartilage articulaire vient tapisser les épiphyses. Les os longs possèdent en leur centre une cavité médullaire qui contient la moelle osseuse.

Le tissu osseux compact correspond à une couche dense, le périoste, qui forme l'extérieur de l'os (Figure 2). L'os spongieux est lui constitué de trabécules, les espaces libres à l'intérieur du maillage sont continus et occupés par la moelle osseuse et par les vaisseaux sanguins. La cavité médullaire est tapissée d'une membrane appelée endoste. En son sein se trouve la moelle osseuse, qui a pour rôle de produire en particulier les cellules sanguines lors de l'hématopoïèse.

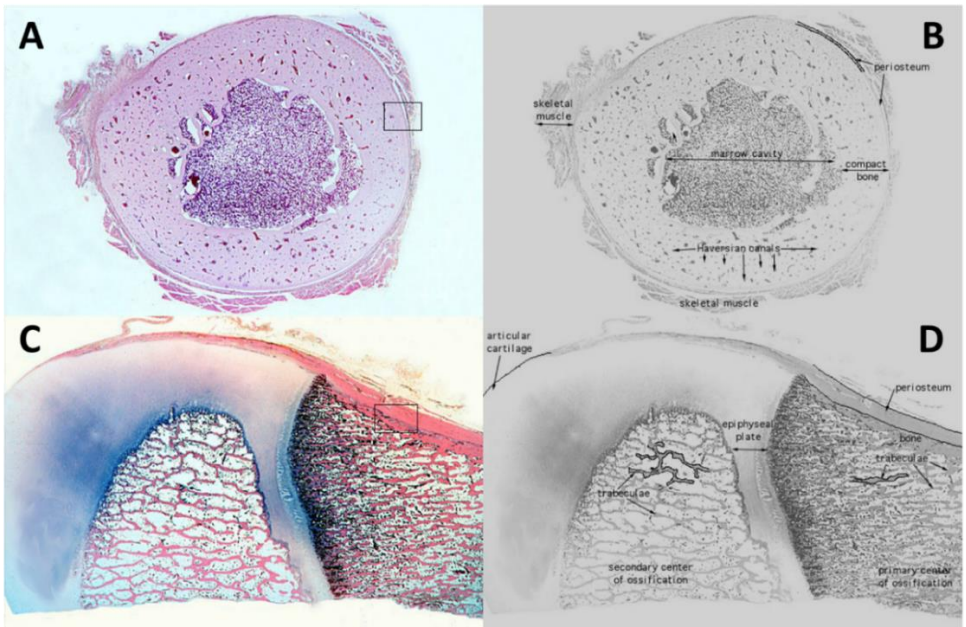


Figure 3 : Coupes histologiques d'un os long (Boston University 2002).

Coupes histologiques transverses colorées avec de l'Hématoxyline-Eosine (HE) (**A**) et observées par microscopie électronique (ME) (**B**), coupes histologiques longitudinales en HE (**C**) et en ME (**D**).

Les coupes histologiques des tissus osseux permettent de distinguer les différentes structures des os (Figure 3). L'os compact compose la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts. Il constitue une enveloppe résistante formée par la juxtaposition d'ostéons cylindriques (Figure 4) de 200 à 300 microns de diamètre. L'orientation des fibres de collagène octroie au tissu cortical une résistance mécanique essentielle.

L'os spongieux est majoritairement présent dans les épiphyses et les métaphyses des os longs ainsi qu'à l'intérieur des os plats et courts. Il est riche en cellules mésenchymateuses impliquées en particulier dans le processus d'ostéogenèse.

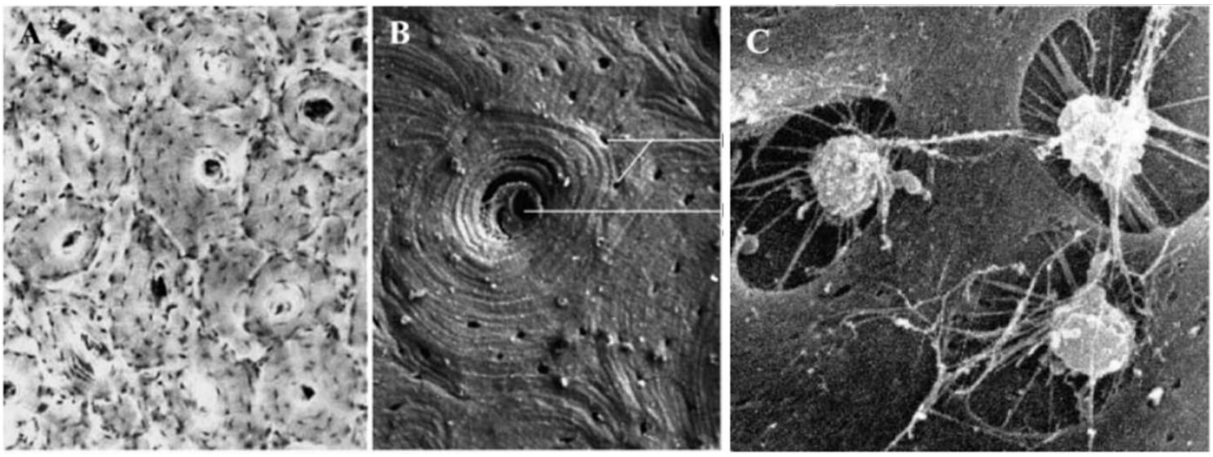


Figure 4 : Ultrastructure de l'os organisé en ostéon (Sommerfeldt & Rubin 2001).

(**A**) Image au microscope optique d'une coupe d'os compact. Les ostéons (ou système haversien) sont visibles. Le cercle noir central correspond au canal de Havers contenant une artère nutritive. Il est entouré de lamelles concentriques de matrice osseuse calcifiée constituée principalement de collagène. Les taches sombres visibles dans les zones compactes sont les lacunes dans lesquelles les ostéocytes sont piégés (×350). (**B**) Micrographie électronique à balayage (MEB) d'un système Haversien (×800). (**C**) Ostéocytes avec des prolongements cellulaires s'étendant vers la paroi lacunaire et permettant la connexion entre les cellules (×1600).

1.1. Le tissu osseux.

Le tissu osseux est, comme tous les tissus conjonctifs, composé de cellules et d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante. La matrice osseuse a la particularité d'être minéralisée, à la différence des autres tissus conjonctifs. L'os est donc considéré comme un matériau composite composé de 60 à 66 % d'une phase inorganique, de 8 à 10 % d'eau et de 24 à 32 % d'une phase organique (Gong *et al*. 1964).

1.1.1. Les cellules osseuses.

Il existe 4 types de cellules osseuses, qui représentent environ 10 % du volume total osseux. Les cellules ostéoprogénitrices (MSC ou *mesenchymal stem cell*) sont à l'origine des cellules ostéoblastiques et des

ostéocytes qui ont pour rôle de synthétiser la matrice osseuse. Les ostéoclastes proviennent de précurseurs pré-ostéoclastiques issus des cellules souches hématopoïétiques. Ils ont pour rôle de dégrader la matrice osseuse et d'assurer les phases du remodelage osseux.

Les cellules souches ostéoprogénitrices sont principalement localisées dans les canaux de Havers et de Volkmann, dans la moelle osseuse, dans l'endosteum et dans la couche interne du périoste (Buck & Dumanian 2012). Elles ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier vers la lignée ostéoblastique (Figure 5) suite à des signaux biochimiques, physiques ou cellulaires, tels que les signaux de migration vers un site de formation osseuse. Elles peuvent également se différencier en chondrocytes et en adipocytes en suivant des voies de différenciations différentes.

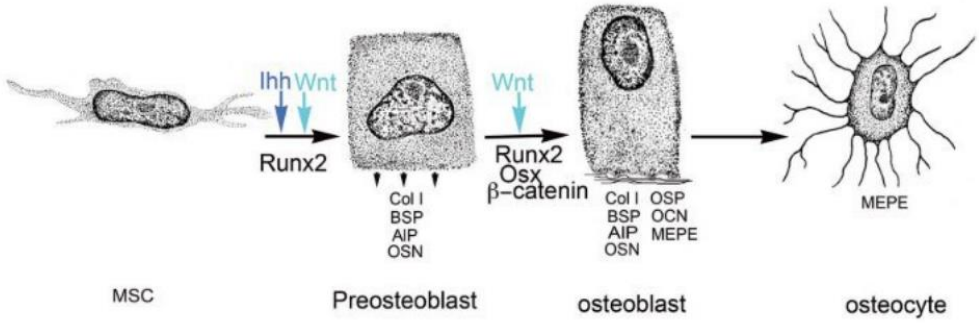


Figure 5 : Facteurs de transcription et marqueurs protéiques exprimés lors de la différenciation ostéoblastique.

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) peuvent se différencier en préostéoblastes sous la signalisation des facteurs **Ihh** (Indian hedgehog) et **Wnt**, puis en ostéoblastes qui donneront finalement les ostéocytes. Les facteurs de transcription mis en jeu sont Runx2, Osterix et β-caténine. Les protéines exprimées sont **ALP** (phosphatase alcaline), **BSP** (sialoprotéine osseuse), **Col I** (collagène de type I), **MEPE** (phosphoglycoprotéine extracellulaire matricielle), **OCN** (ostéocalcine), **OSN** (ostéonectine), **OSP** (ostéopontine).

Les ostéoblastes sont les cellules qui forment le tissu osseux et qui sécrètent le collagène de type I ainsi que d'autres protéines non collagéniques. Elles sont de forme cubique avec un noyau rond, et mesure de 20 à 30 µm. Lorsqu'elles sont au repos, elles sont appelées cellules bordantes. Elles dérivent des cellules souches mésenchymateuses (Figure 5) et se différencient sous la dépendance du facteur « *Runt-related transcription factor 2* » (Runx2). Il s'agit d'un facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes spécifiques du tissu osseux, comme le collagène de type 1 alpha-1 (Col1A1), l'ostéonectine (OSN), la phosphatase alcaline (ALP) ou encore la sialoprotéine osseuse (*BSP*) (Ducy *et al*. 2000). En plus de Runx2, deux autres facteurs contrôlent la différenciation des cellules ostéoblastiques vers l'ostéoblaste, à savoir les facteurs ostérix et β-caténine. Les marqueurs de différenciation plus tardifs sont l'ostéocalcine (OCN) et l'ostéopontine (OPN). D'un point de vue histologique, les ostéoblastes sont organisés en groupes cellulaires de 100 à 400 cellules autour des sites de formation osseuse (Figure 6).

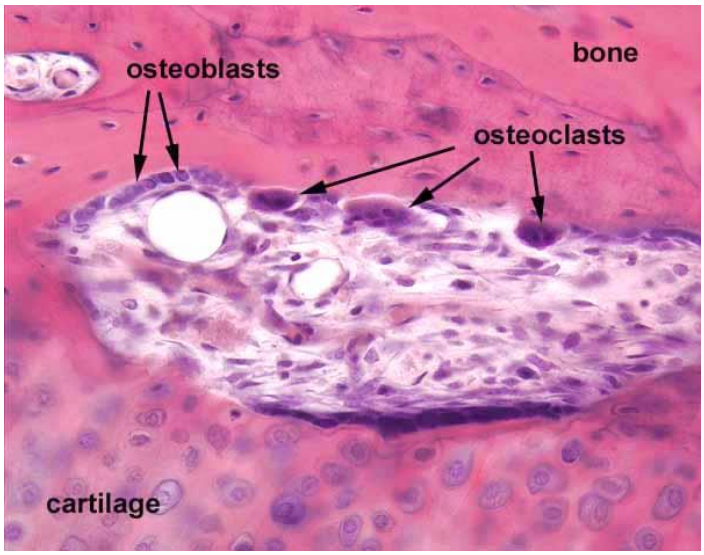


Figure 6 : Coupe histologique mettant en évidence une lacune de résorption ainsi que les cellules osseuses matures que sont les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes (K. MacCallum 1990).

Les ostéocytes sont les ostéoblastes du tissu osseux mature. Ils sont emprisonnés dans des lacunes de la matrice osseuse minéralisée appelées ostéoplastes, et peuvent survivre plusieurs dizaines d'années. Grâce à leurs prolongements cytoplasmiques appelés dendrites, ils dialoguent avec les autres ostéocytes et les ostéoblastes *via* des jonctions communicantes. Ce réseau leur permet de transmettre les variations des stimulations mécaniques et biochimiques qui influencent leur métabolisme. Pendant très longtemps ils ont été considérés comme des cellules passives, mais ils ont des fonctions essentielles dans le support du métabolisme osseux comme le maintien de la matrice osseuse et le contrôle de l'homéostasie de la calcémie.

Les ostéoclastes dérivent des cellules souches hématopoïétiques, et plus spécifiquement des monocytes. Ce sont de grosses cellules plurinucléées (5 à 50 noyaux) d'environ 100 µm de diamètre, ayant une durée de vie de 12 jours. Elles ont pour rôle de détruire le tissu osseux (Figure 6). Ce sont des cellules polarisées qui possèdent des microvillosités au pôle basal et qui vont détruire les travées osseuses par acidification et libération d'enzymes telles que la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) et la cathepsine K. La dégradation de la matrice est un processus contrôlé qui va entraîner le relargage des minéraux et des facteurs solubles afin de réguler la calcémie et le remodelage osseux.

1.1.2. La matrice extracellulaire minéralisée.

La matrice extracellulaire (MEC) désigne tous les composants matriciels se trouvant dans l'espace extracellulaire. Elle permet de donner une structure à l'os et de servir de support pour l'attachement et la migration des cellules. La MEC osseuse a la particularité d'être minéralisée ce qui la rend composite. Elle est donc composée d'une partie inorganique et d'une partie organique.

Des sels minéraux sont présents dans la phase inorganique. Ils sont majoritairement sous forme de carbonate et de phosphate de calcium, mais d'autres formes comme le carbone calcique ($CaCO_3$) et l'hydrogénure de magnésium ($Mg(OH)_2$) sont retrouvés en plus faible quantité. Les phosphates de calcium peuvent être amorphes mais ils sont majoritairement sous forme de cristaux d'hydroxyapatite de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Ces cristaux sont organisés en très fines aiguilles hexagonales d'une centaine d'ångströms de long, localisés de façon périodique à l'intérieur des fibres de collagène.

Dans le tissu osseux d'un adulte, il y a en moyenne 1100 g de calcium, soit 99 % du calcium total de l'organisme, et 600 g de phosphore, soit 85 % du phosphore total de l'organisme. Cela rend les os opaques aux rayons X, ce qui permet d'étudier leur structure par des techniques de radiographie ou de microtomographie aux rayons X à haute résolution (micro-CT). L'os est donc le réservoir phosphocalcique du corps humain. Il a une fonction primordiale dans le contrôle du métabolisme phosphocalcique conjointement avec l'intestin et les reins. Sous l'effet des pressions mécaniques, liées à l'activité physique par exemple, le remodelage constant du tissu osseux entraîne la libération ou le stockage de sels minéraux.

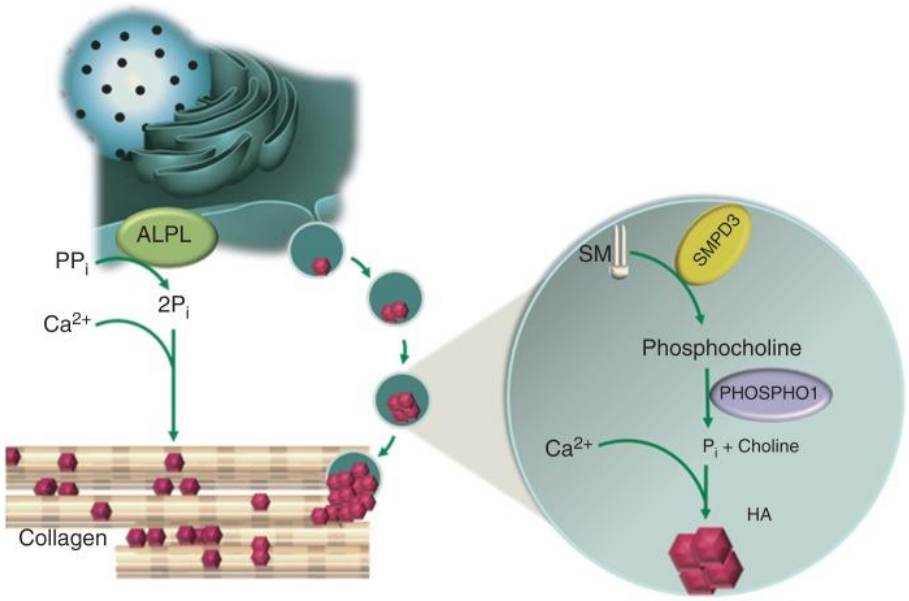


Figure 7 : Synthèse de l'hydroxyapatite (HA) lors de la minéralisation de la MEC osseuse (Murshed 2018).

Deux processus de minéralisation sont connus. Le premier processus repose sur l'activité de la phosphatase alcaline (**ALPL**), enzyme membranaire des ostéoblastes, qui clive le pyrophosphate inorganique (**PPi**) en 2 **Pi** (phosphate inorganique). Les fibres de collagène en structure compacte présentent des lacunes nanométriques intra et interfibrillaires accessibles à l'HA. Le second processus de minéralisation se fait en présence de phosphocholine dans les vésicules matricielles (**VM**). Ces VM transportent les enzymes SMPD3 et PHOSPHO1, qui favorisent la minéralisation intracellulaire en bourgeonnant à partir des cellules en phase de minéralisation. Une augmentation du Pi intravésiculaire conduit à sa précipitation avec le Ca^{2+} pour former les cristaux naissants d'hydroxyapatite (HA).

La minéralisation de la MEC osseuse peut se faire selon deux processus. Le plus connue implique l'activité de la phosphatase alcaline (ALP). Cette enzyme est présente au niveau des membranes des

ostéoblastes. Elle va cliver le phosphate majoritairement disponible sous la forme de pyrophosphate (PPi) en 2 phosphate inorganique (Pi) (Figure 7). En présence de Ca^{2+} et lorsque le Pi est disponible, la cristallisation de l'hydroxyapatite se fait alors spontanément dans les lacunes des fibres de collagène (Orimo 2010). Un second processus de minéralisation existe. Il utilise les phospholipides constituant les vésicules membranaires comme source de Pi plutôt que le PPi. Ces vésicules transportent des enzymes telles que la PHOSPHO1, qui va cliver la phosphocholine en Pi et en choline (Murshed 2018). L'hydroxyapatite alors formée se fixera sur les fibres de collagène.

La phase organique est composée essentiellement de protéines. La protéine majoritaire est le collagène de type I (95 %) qui s'organise en fibres. Les autres protéines non collagéniques contrôlent le métabolisme osseux et la minéralisation du collagène. Parmi ces protéines il y a les protéoglycanes, l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine, la fibronectine, la thrombospondine, la sialoprotéine osseuse et les protéines morphogénétiques osseuses (*BMP*) (Florencio-Silva *et al*. 2015). Les fibres de collagène de la MEC osseuse sont reliées au tissu osseux par les intégrines (Figure 8). Cet agencement confère au tissu sa rigidité et sa résistance.

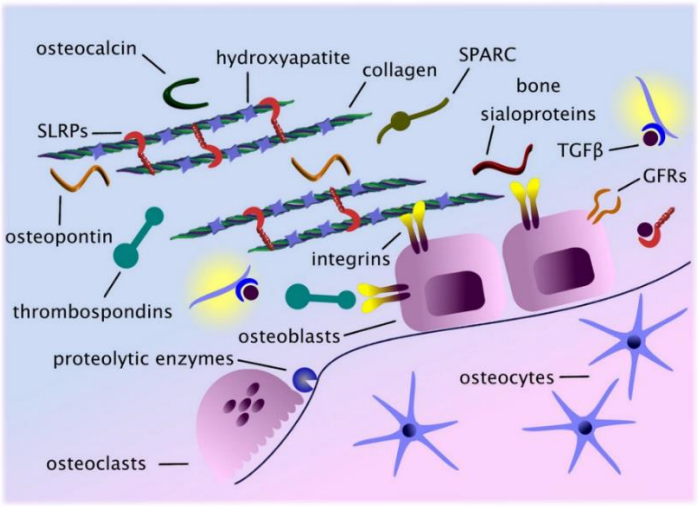


Figure 8: Représentation schématique de jonction entre cellules de l'os et MEC osseuse (Karamanos *et al*. 2021).

L'os est un tissu conjonctif spécialisé, avec une MEC riche en collagène, minéralisé avec la présence de l'hydroxyapatite. Les PG et les protéines osseuses spécialisées régulent l'assemblage du collagène, tandis que les sialoprotéines osseuses, l'OPN, l'OCN et les thrombospondines contrôlent le métabolisme osseux et la minéralisation de la MEC. Les composants cellulaires contrôlent le développement osseux et l'homéostasie par la sécrétion de facteurs de croissance. Les cellules osseuses sont les ostéoblastes formant le tissu osseux et les ostéoclastes impliqués dans la résorption osseuse. Le tissu osseux mature renferme également des ostéocytes emmurés dans la MEC.

1.2. Le tissu cartilagineux.

Chez le fœtus, le tissu cartilagineux constitue la plus grande partie du squelette. Une partie de ce squelette cartilagineux va devenir de l'os, on parle alors d'ossification endochondrale. À l'âge adulte,

il tapisse la surface des articulations entre les os et dans la cage thoracique. On le retrouve aussi dans l'oreille, le nez, les bronches et les disques intervertébraux. C'est un tissu conjonctif spécialisé qui résiste aux forces de compression. Il est aussi plus élastique et plus souple que le tissu osseux. Sa surface est lisse et nacrée.

Il existe 3 types de cartilage qui sont le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le fibro-cartilage. Le cartilage hyalin est le plus abondant. Il est localisé au niveau des cartilages articulaires et est en contact avec le tissu osseux. Il permet le mouvement d'un os par rapport à l'autre en réduisant les frictions et en distribuant de façon uniforme le poids sur l'articulation. Il est composé de chondroblastes et de chondrocytes, et sa matrice extracellulaire est composée de fibres de collagène et de protéoglycanes. Il n'est ni vascularisé ni innervé, et est incapable de se régénérer. Une fois que le cartilage est endommagé par des sur-sollicitations mécaniques, par exemple lors d'un surpoids, d'un excès de sport, ou encore lors du vieillissement, sa cicatrisation est difficile et il ne peut être réparé.

1.3. Le tissu vasculaire dans l'os.

Le système vasculaire osseux joue un rôle prédominant pour maintenir l'activité des cellules souches progénitrices et résidentes et leur recrutement. Il permet de réguler l'ostéogenèse, l'hématopoïèse et l'angiogenèse en diffusant les molécules nécessaires, et permet également l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules environnantes. La vascularisation est donc essentielle à la croissance osseuse, à son remodelage et à sa réparation.

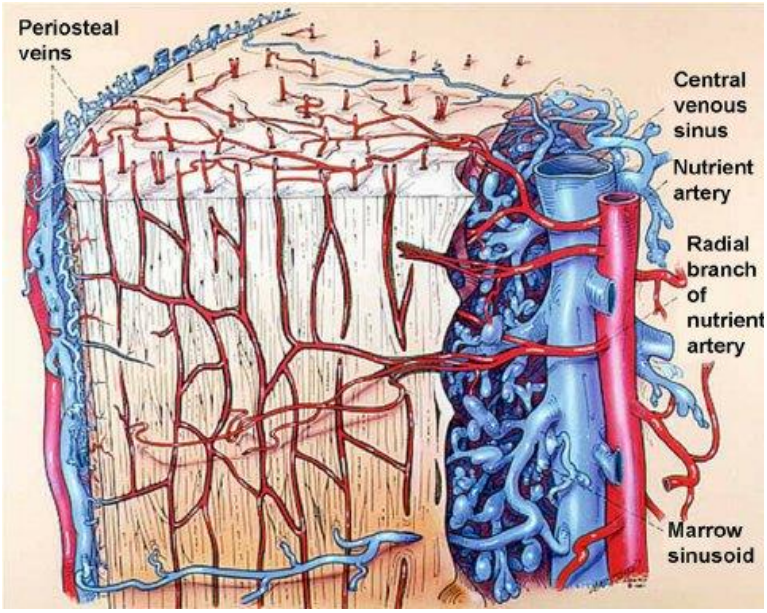


Figure 9 : Systèmes d'artères nourricières et périostées sur une section d'os (Cowin & Cardoso 2015).

Il existe deux types de systèmes vasculaires dans les os. Un système central qui donne les artères nourricières à l'épiphyse, la métaphyse et la diaphyse, et un système d'artères périphériques périostées (Figure 9). Ce sont les muscles qui amènent les 2/3 de la vascularisation dans l'os cortical, grâce à leur insertion sur le périoste.

Les nutriments, l'oxygène et les facteurs solubles pénètrent dans la moelle osseuse principalement par l'artère centrale, qui se ramifie en artérioles, puis à travers les vaisseaux de transition dans un vaste réseau de sinusoïdes et de vaisseaux fenêtrés.

1.3.1. Structure des vaisseaux sanguins.

Il existe 3 types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires. Les artères et les veines sont composées de plusieurs couches, une tunique interne ou endothélium composé de cellules endothéliales, une tunique moyenne de tissu musculaire lisse, et une tunique externe de tissu conjonctif composé de cellules périvasculaires telles que les « *Vascular Smooth Muscle Cells* » (VSMC) et les péricytes (Figure 10).

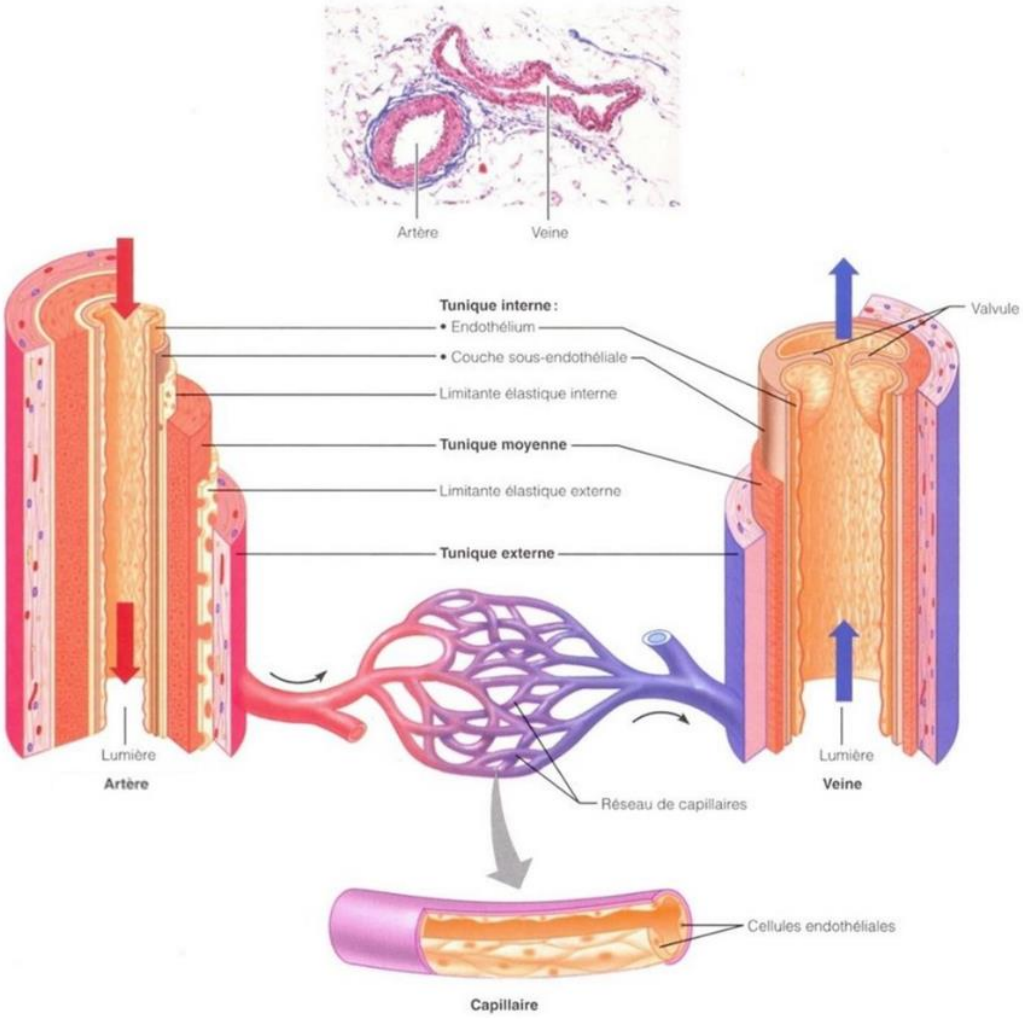


Figure 10 : Structure schématique et histologique des vaisseaux sanguins (Benhamza 2020).

Les artères transportent le sang en dehors du cœur, elles ont une paroi plus épaisse et une lumière plus petite que les veines. Les capillaires sont des vaisseaux sanguins microscopiques (7 à 10 µm) qui forment de vastes réseaux à travers les tissus, ils représentent à eux seuls plus de 80 % de la longueur totale des vaisseaux sanguins.

En conditions physiologiques le système circulatoire est fermé, le sang ne quitte le réseau qu'en cas de blessure ou de maladie. Toutefois, de nombreux échanges ont lieu au niveau des fines parois capillaires qui sont composées d'une seule couche de cellules endothéliales.

1.3.2. Organisation des vaisseaux sanguins dans l'os.

Les vaisseaux sanguins (ainsi que les nerfs) pénètrent les os au niveau d'orifices à la surface des os appelés foramens. Il en existe de 3 types, le foramen nourricier principal, de second et de troisième ordre.

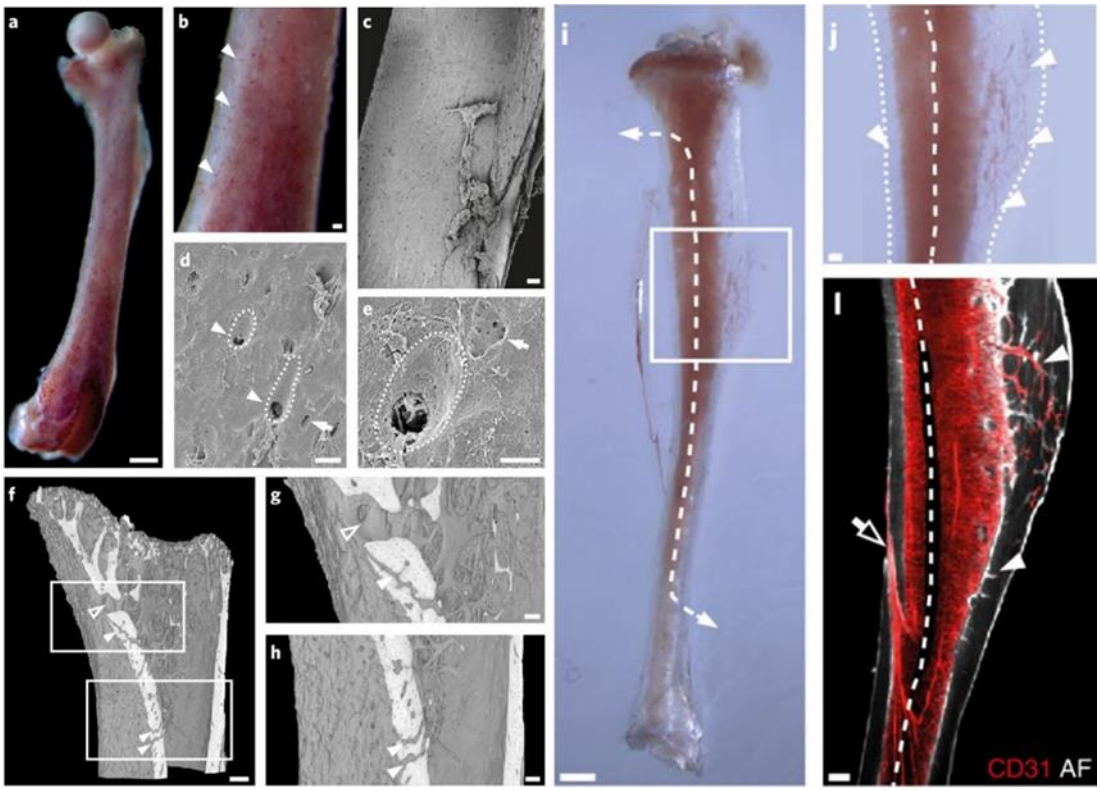


Figure 11 : Foramens permettant l'entrée des vaisseaux sanguins dans la diaphyse des os longs, adapté de Grüneboom *et al.*, 2019.

Mise en évidence des foramens. (**a**) Fémur murin montrant de multiples vaisseaux exposés à la surface. (**b**) Zoom sur les pores remplis de sang à la surface de l'os (montrés par les flèches). (**c**, **d**, **e**) Images en microscopie électronique montrant le nombre élevé de pores à la surface de l'os fémoral, (**d** et **e**) zoom au niveau de ces pores d'environ 10 µm de diamètre.
Pénétration des vaisseaux au niveau des foramens. (**f**) Reconstruction 3D d'un tibia par micro-CT permettant de visualiser des canaux de différentes tailles traversant l'os cortical. (**g**, **h**) Grossissement des zones encadrées. (**i**) Techniques de « transparisation » d'un tibia entier permettant de visualiser les vaisseaux dans l'os cortical et un canal central dans la moelle osseuse (ligne pointillée). (**j**) Grossissement de la zone encadrée blanche (dans la figure i) montrant un réseau complexe de canaux remplis de sang dans l'os cortical (pointes de flèches remplies, surface de l'os indiquée par la ligne pointillée). Barres d'échelle : 1000 µm pour a et i ; 500 µm pour f ; 100 µm pour b, g, f et j ; 20 µm pour d; et 10 µm pour e.

Le foramen nourricier principal permet le passage de l'artère nourricière et des prolongements neuronaux se rendant à la moelle. Les pores nourriciers de second ordre sont plus petits, situés sur les épiphyses (excepté sur la couche cartilagineuse), et permettent le passage des veines. On en dénombre au moins 140 uniquement sur la tête inférieure du fémur. Les orifices de troisième ordre sont invisibles à l'œil nu et sont situés sur toute la surface de la diaphyse (Figure 11 a, b, c, d et e). Ils reçoivent des capillaires partant du périoste et se continuent dans la matrice osseuse par les canaux de Havers.

Les vaisseaux sanguins présents dans les os peuvent être identifiés selon leur niveau d'expression de l'endomucine (Emcn) et de CD31 (aussi appelé PECAM pour « *Platelet endothelial cell adhesion molecule »*). Les vaisseaux de type H (*High expression*) expriment fortement Emcn et CD31, *a contrario*, les vaisseaux de type L (*Low expression*) n'expriment que peu ces protéines. Kusumbe et ses collaborateurs (Kusumbe *et al*. 2014) ont été les premiers à identifier les vaisseaux sanguins de type H dans l'os trabéculaire et cortical au niveau des plaques de croissance et le long des membranes périostées et endostées. Ces zones présentent un arrangement dense en cellules ostéoprogénitrices qui expriment fortement le facteur Osterix et qui peuvent se différencier en ostéoblastes puis en ostéocytes. Cette proximité entre ostéoprogéniteurs et vaisseaux de type H permet une ressource en ostéoblastes rapidement mobilisable pour la formation/réparation osseuse. Les vaisseaux sanguins de type L sont principalement situés dans la diaphyse (Mosteo *et al*. 2021).

Les vaisseaux de type H sont plus abondants chez les enfants et les adolescents possédant des os en croissance car ils sont principalement localisés à proximité de la plaque de croissance (Figure 12). En effet, l'allongement des os se produit au niveau des plaques de croissance. La matrice cartilagineuse est remplacée par de l'os minéralisé par ossification endochondrale, et va être digérée par les ostéoclastes associés aux vaisseaux de type H qui vont stimuler les cellules endothéliales *via* la libération de métalloprotéinase 9 (Romeo *et al*. 2019). Ce processus est également impliqué lors de la réparation osseuse : après une fracture, une ébauche cartilagineuse est formée, avant d'être résorbée puis remplacée par de la matrice calcifiée.

Chez les mammifères la densité minérale osseuse diminue avec l'âge. Farr et collaborateurs (Farr & Khosla 2019) ont montré que la diminution de la densité osseuse est associée à une diminution des ostéoprogéniteurs dans les os longs des souris et à une diminution des vaisseaux de type H (Figure 12).

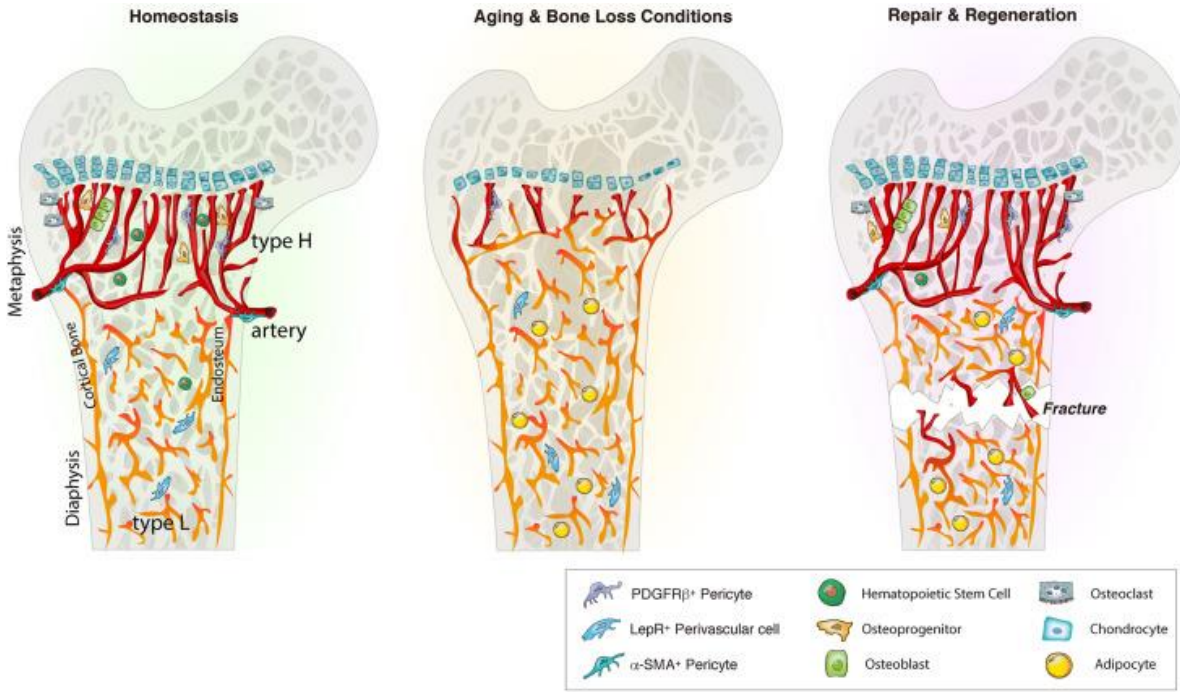


Figure 12 : Organisation des vaisseaux sanguins dans la moelle osseuse saine, vieillissante et lors de la régénération (Stucker *et al*. 2020).

En homéostasie, l'os jeune présente une abondance de vaisseaux de type H dans les régions métaphysaires. L'endothélium de type H est étroitement associé aux ostéoprogéniteurs et stimule l'angiogenèse et l'ostéogenèse *via* des facteurs angiogéniques. Au cours du vieillissement et de la perte osseuse, la densité des vaisseaux de type H diminue. Cette baisse s'accompagne d'une diminution des ostéoprogéniteurs, réduisant l'ostéogenèse et la masse osseuse. Le vieillissement réduit également le nombre de cellules souches hématopoïétiques (CSH) tout en augmentant le compartiment adipocytaire. Les lésions osseuses telles que les fractures stimulent la prolifération et la différenciation des vaisseaux de type H, des ostéoprogéniteurs et des CSH pour stimuler l'angiogenèse et l'ostéogenèse qui guident la réparation et la régénération osseuses. LepR : récepteur de la leptine.

1.3.3. Formation de nouveau vaisseaux sanguins et angiogenèse.

Pendant le développement du fœtus les vaisseaux sanguins se mettent en place grâce à la vasculogenèse. À l'âge adulte, les nouveaux vaisseaux sanguins vont se développer par le processus d'angiogenèse à partir des vaisseaux préexistants.

Les nouveaux vaisseaux obtenus lors de l'angiogenèse vont être formés par bourgeonnement (*sprouting*). Les cellules endothéliales vont être activées par des angiopoïétines et des facteurs pro-angiogéniques tels que les « *Vascular Endothelial Growth Factor* » (VEGF), le « *Fibrobast Growth Factor* » (FGF) ou encore le « *Platelet-Derived Growth Factor* » (PDGF). La membrane basale du vaisseau ainsi que la MEC vont alors être dégradées.

Les péricytes sont des cellules périvasculaires qui s'enroulent autour des capillaires sanguins (Figure 13). Ils possèdent des prolongements cytoplasmiques permettant la communication avec les cellules endothéliales. Ils expriment la même actine contractile que celle du muscle lisse. Les cellules endothéliales spécialisées, appelées *Tip cells,* ont une forme conique. Elles vont guider les cellules endothéliales qui les suivent et détecter dans leur environnement les facteurs pro-angiogéniques. Ceci

est possible grâce à leur filopodes mobiles qui expriment les récepteurs du VEGF. Les capillaires en croissance vont alors se développer en fonction des gradients de VEGF (Figure 13). Les *Tip cells* sont suivies par des cellules de tige proliférantes, moins mobiles, qui expriment le récepteur Tie2 et recrutent des péricytes.

Dans le cas d'une fracture osseuse, le réseau vasculaire va être endommagé : sa réparation par angiogenèse est nécessaire pour éviter la nécrose du tissu lésé.

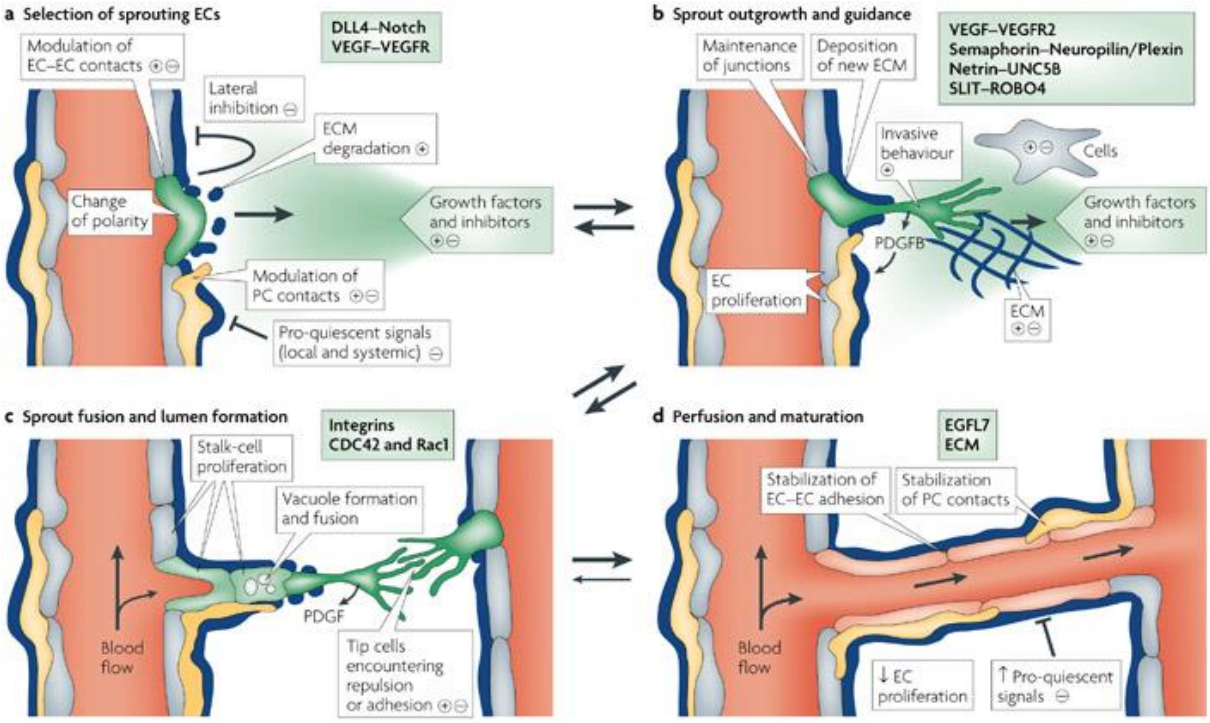


Figure 13 : Principales étapes de l'angiogenèse (Adams & Alitalo 2007).

Les cellules endothéliales sont représentées en gris. Les cellules endothéliales spécialisées (*Tip cells)* sont en vert, elles possèdent des extensions cytoplasmiques de type filopodes. Les péricytes sont représentés en jaune. Les cellules endothéliales sont contrôlées par une balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques. (**a**) Les cellules endothéliales qui vont bourgeonner vont être activées. Des protéases vont être libérées et vont dégrader la MEC localement. (**b**) Un gradient de facteurs pro-angiogéniques notamment de VEGF va guider la croissance du bourgeon. (**c**) Les *Tip cells* vont fusionner avec les *Tip cells* des vaisseaux adjacents (**d**) pour former un nouveau vaisseau sanguin.

1.4. Le tissu nerveux dans l'os.

1.4.1. Généralités sur le système nerveux.

Le système nerveux est un réseau complexe et nécessaire à la transmission de l'information. Il est composé de l'encéphale (cerveau, cervelet et tronc cérébral), de la moelle épinière et des nerfs. On distingue le système nerveux central (SNC) formé de l'encéphale et de la moelle épinière du système nerveux périphérique (SNP) qui est lui composé des ganglions et des nerfs sensitifs et moteurs. Ces derniers ont pour rôle de transmettre les signaux provenant du SNC vers les différents organes, dont les os, et permet de tenir informé le cerveau des besoins de l'organisme et des ressources disponibles dans l'environnement.

Le SNP est composé de nerfs végétatifs et somatiques. Les nerfs végétatifs interviennent dans la régulation des fonctions vitales internes, permettant la digestion, la respiration, la circulation sanguine, la sécrétion ou l'excrétion d'hormones. Le système nerveux sensoriel fait partie du SNP qui interprète les informations sensorielles. Les neurones sensoriels ont pour rôle de transmettre ces informations depuis les viscères, les organes sensoriels, les muscles, les os et les articulations vers le SNC où l'information est perçue et interprétée.

Les nerfs sont constitués de fibres nerveuses qui renferment les axones des neurones ainsi que les cellules de Schwann (Figure 14). En périphérie, cette gaine est appelée le périnèvre. Les fibres nerveuses sont séparées les unes des autres par un fin tissu conjonctif, l'endonèvre. Elles sont parfois regroupées en fascicules par du tissu conjonctif beaucoup plus abondant, l'épinèvre. Des vaisseaux sanguins sont présents dans les trois gaines conjonctives.

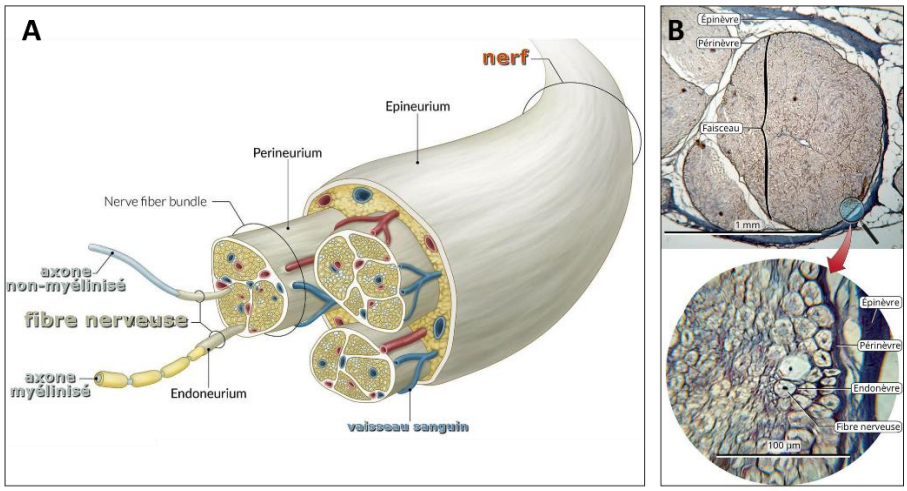


Figure 14 : Représentation schématique (A) et coupe histologique (B) d'un nerf (Van In 2022).

1.4.1.1. Les cellules nerveuses.

Le système nerveux est composé des cellules gliales et de neurones, en quantités équivalentes. Les cellules gliales sont indispensables au bon fonctionnement des neurones en les soutenant et les protégeant, en leur apportant des éléments nutritifs, en éliminant leur déchet et en accélérant la conduction du message nerveux. Elles ont donc un rôle majeur dans le développement, la plasticité, le vieillissement et les pathologies du SN (Hemonnot-Girard *et al*. 2021). Les neurones permettent la transmission de l'information dans tout l'organisme.

1.4.1.1.1. Les cellules neuronales périphériques.

Pour assurer les différentes fonctions neuronales, les cellules gliales jouent un rôle important (Figure 15). Dans le SNC les astrocytes ont un rôle de support. La microglie assure la défense, ce sont les macrophages du cerveau. Les oligodendrocytes forment la gaine de myéline entourant certains

axones. Les cellules épendymaires sont des cellules épithéliales ayant pour fonction de produire le liquide céphalo-rachidien.

Dans le SNP on trouve les cellules de Schwann et les cellules satellites gliales. Les cellules de Schwann entourent certaines fibres nerveuses ou axones pour constituer une enveloppe isolante, la gaine de myéline : la vitesse de propagation du message nerveux le long de l'axone sera alors accélérée. Les cellules satellites gliales, aussi appelées cellules de Schwann non myélinisantes, sont des petites cellules qui entourent les neurones. Elles sont localisées au niveau des ganglions (Hemonnot-Girard *et al*. 2021) et forment une couche de cellules aplaties autour des neurones ganglionnaires.

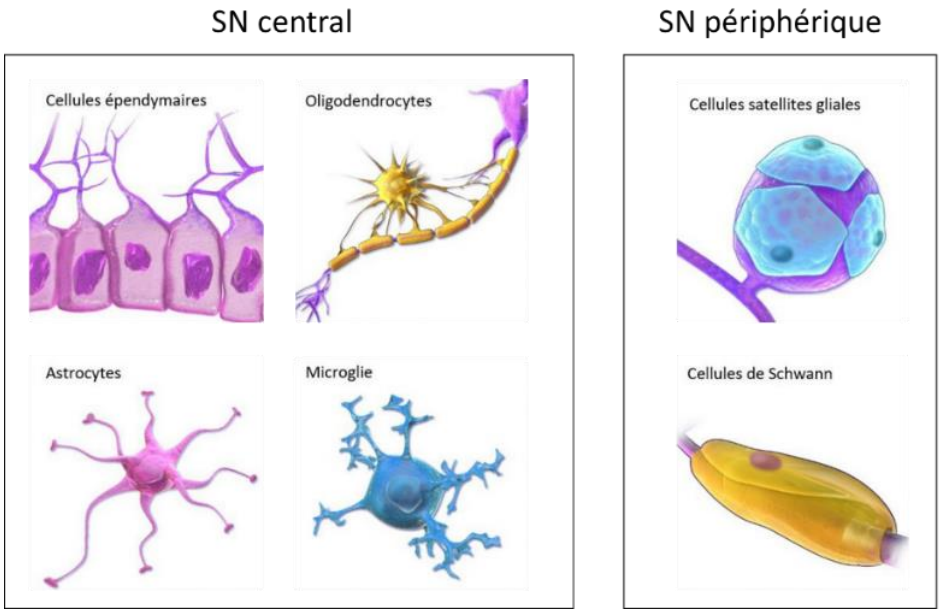


Figure 15: Représentation schématique des cellules gliales du SNC et SNP (Vollette 2020).

1.4.1.1.2. Les neurones.

Les neurones constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux. Ce sont des cellules excitables qui vont générer et transmettre les informations au sein de l'organisme ou entre l'environnement et l'organisme à travers des signaux nerveux. Ces signaux peuvent être soit électriques soit biochimiques (neurotransmetteurs) et vont être transmis à d'autres neurones ou à d'autres cellules pour les activer.

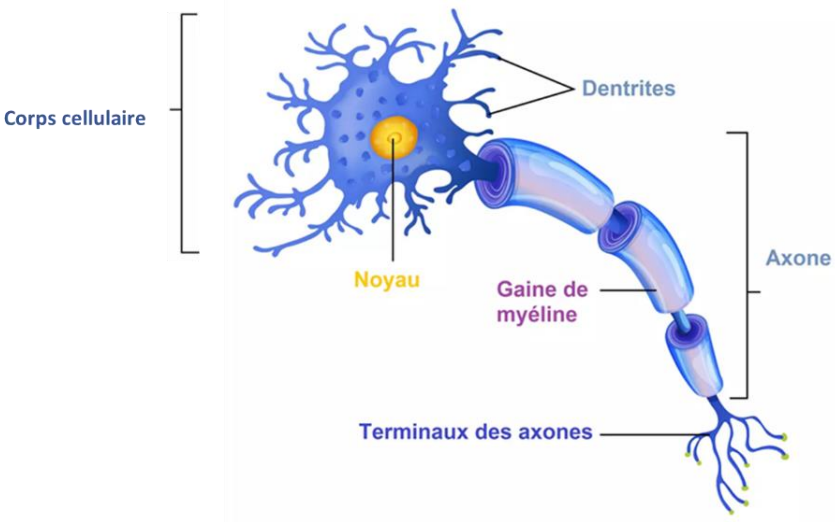


Figure 16 : Représentation schématique d'un neurone du SNP (Matthew Cole 2018).

Chacun des neurones est composé d'un corps cellulaire et de neurites. Les neurites peuvent être des axones ou des dendrites. Il n'existe qu'un seul axone par neurone alors qu'il peut y avoir plusieurs dendrites pour une même cellule nerveuse. Les informations nerveuses vont être apportées au niveau des ramifications dendritiques. L'axone peut atteindre une longueur de 1 mètre, et faire de 1 à 15 µm de diamètre. C'est par l'axone que les informations vont être transmises. Autour de cet axone une gaine de myéline peut être présente, elle est synthétisée par les cellules de Schwann et permet l'accélération de la propagation de l'influx nerveux.

1.4.1.2. Transmission de l'information nerveuse.

Le message neuronal est transmis au niveau des synapses, qui peuvent être jusqu'à 100 000 par neurone. La synapse est donc une zone de communication entre deux cellules dont au moins l'une est un neurone. La seconde cellule peut alors être une cellule musculaire (jonction neuro musculaire), une cellule épidermique, une cellule vasculaire ou encore une cellule osseuse.

Il existe deux types de synapses selon l'information transmise. La synapse électrique et la synapse chimique. La synapse électrique est minoritaire mais essentielle. Elle nécessite que les deux neurones soient reliés par des jonctions communicantes de type GAP. L'information est alors transmise en 100 µs.

Les synapses chimiques sont les plus nombreuses, elles permettent une modulation plus fine de l'information selon les types de neurotransmetteurs (nt) et de récepteurs impliqués. L'information envoyée a aussi une durée plus longue qui varie de 0.5 à 1.5 ms.

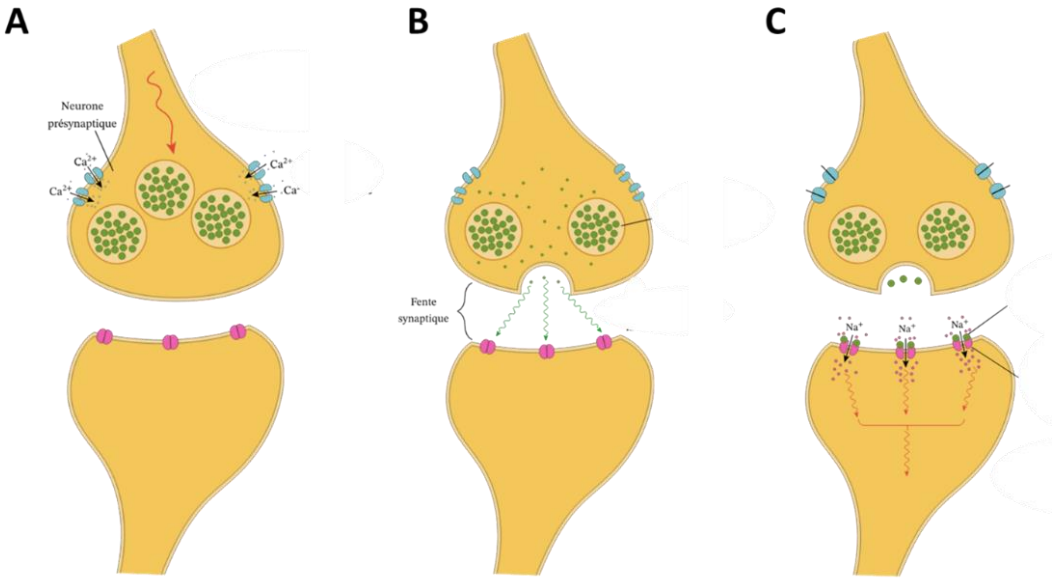


Figure 17 : Diffusion du message nerveux chimique au niveau des synapses neuronales, adapté de Nagwa 2022.

(**A**) Ouverture des canaux calciques lorsqu'un PA (flèche rouge) arrive dans le neurone pré-synaptique. (**B**) Les vésicules contenant le Nt fusionnent avec la membrane présynaptique, ce qui va libérer le Nt au niveau de la fente synaptique. (**C**) Liaisons des Nt sur leurs récepteurs dans le neurone post-synaptique, ouverture des canaux sodiques et génération d'un nouveau PA. Nt = neurotransmetteur, PA = Potentiel d'action.

Après avoir généré et propagé un potentiel d'action (PA) le long de son axone, le neurone pré-synaptique va transmettre ce signal en libérant des nt dans la fente synaptique (Figure 17). Brièvement, lorsqu'un PA arrive dans les dendrites, le neurone pré-synaptique est dépolarisé, les canaux calciques s'ouvrent et le calcium est libéré. Les vésicules contenant les nt vont les libérer dans la fente synaptique, et ces nt vont pouvoir se lier à leurs récepteurs sur la membrane du neurone post-synaptique. Les canaux sodiques vont s'ouvrir et permettre le passage des ions sodium générant un PA dans la dendrite du neurone post-synaptique.

1.4.1.3. Lien entre développement de l'os et innervation.

Chez l'humain, les premières fibres nerveuses apparaissent dès le 15ème jour de gestation dans le périchondre de la diaphyse des os longs. Au jour 19, les terminaisons nerveuses apparaissent et l'innervation devient alors fonctionnelle. L'apparition des terminaisons nerveuses coïncide avec l'expression de neuropeptides spécifiques des fibres nerveuses sensitives, tels que la substance P et le « *calcitonin gene-related peptide* » (CGRP) (Sisask *et al*. 1995). Ces événements ont lieu en parallèle du développement du périoste diaphysaire et du début de l'ostéogenèse dans le centre des os longs.

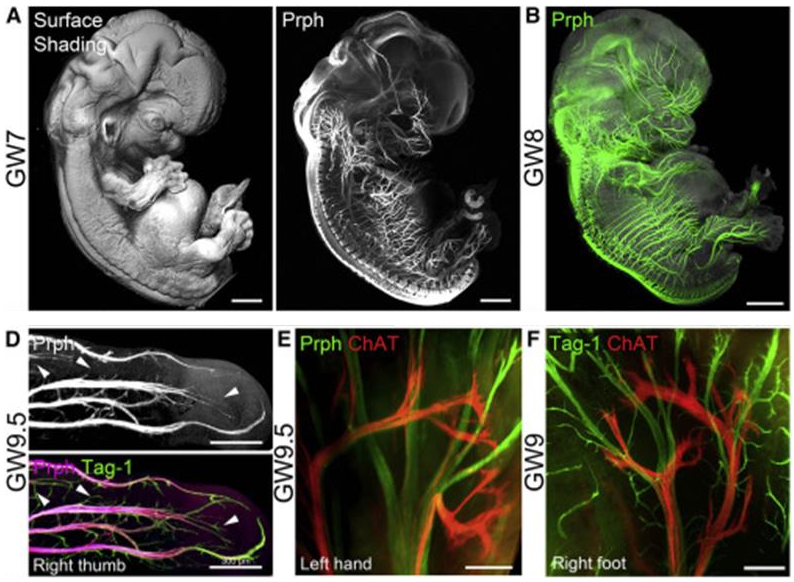


Figure 18: Développement du système nerveux périphérique en 3D dans les embryons humains (Belle *et al*. 2017).

Immunomarquage d'embryon humain (premier trimestre de gestation) « transparisé » par 3DISCO. (**A**) Image d'ombrage de surface (à gauche) et marquage de la Prph des nerfs périphériques (à droite) à 7 semaines de gestation. (**B**) Superposition de l'image d'ombrage de surface (gris) et immunomarquage de la Prph (vert) à 8 semaines de gestation. (**D**) Pouce à 9 semaines et demi de gestation marqué pour la Prph et Tag-1. (**E**) Vue dorsale d'une main à 9 semaines et demi de gestation immunomarquée pour ChAT (axones moteurs) et Prph (axones sensoriels). (**F**) Vue dorsale d'un pied à 9 semaines de gestation immunomarqué pour ChAT et Tag-1.
Barres d'échelle : (A) 1 000 µm, (B) 500 µm, (D) 200 µm, (E) et (F) 150 µm. **Prph** = Périphérine, protéine de filament intermédiaire spécifique aux neurones. **ChAT** = choline acétyl transférase (innervation motrice). **Tag-1** = glycoprotéine d'adhésion transitoire-1 (innervation sensorielle).

Les nerfs sensitifs s'étendent aux métaphyses 6 semaines après gestation, puis aux épiphyses 8 semaines après gestation (Belle *et al*. 2017), parallèlement à la progression de l'ossification endochondrale. L'innervation autonome se met en place après l'innervation sensitive ; les fibres nerveuses sympathiques contenant le « *vasoactive intestinal peptide* » (VIP) et le neuropeptide Y (NPY) sont seulement détectées à la naissance dans le périchondre, puis dans la diaphyse.

Ces changements dans la distribution des fibres nerveuses au cours de la croissance de l'os et de son ossification, montrent le rôle de l'innervation dans ces processus. Dans un os adulte, métaboliquement moins actif, l'innervation est essentiellement localisée au niveau des zones actives de remodelage osseux. Enfin, des expériences de dénervation chez le rat ont montré que ces os « dénervés » avaient une croissance osseuse diminuée (Edoff *et al*. 1997).

1.4.2. L'innervation de l'os.

Les nerfs périphériques participent au développement et à la réparation des os *via* une multitude de signaux générés par la sécrétion de neurotransmetteurs (nt), de neuropeptides, de facteurs de guidage axonal et de neurotrophines. En retour, l'os protège les nerfs dans son espace interne.

Les fibres nerveuses qui sont présentes dans l'os sont d'origine sensitive et autonome (sympathique). Les corps cellulaires des fibres sympathiques innervant l'os prennent leur origine dans les ganglions

sympathiques, tandis que les fibres sensitives sont issues des ganglions spinaux et trigéminaux (Figure 19). Les axones périphériques se prolongent vers les tissus cibles par le biais de faisceaux nerveux.

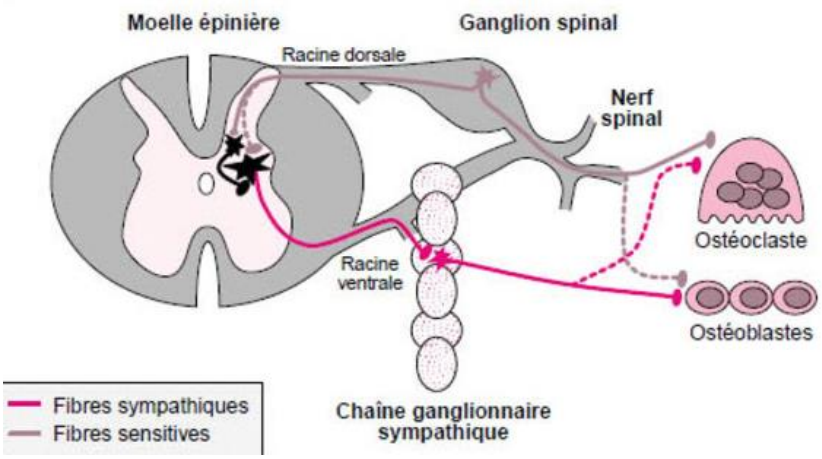


Figure 19 : Origine des fibres nerveuses destinées à l'os (Chenu 2001).

Le système nerveux autonome (système sympathique) utilise deux types de neurones entre le système nerveux central et l'os. Le corps cellulaire du neurone préganglionnaire est localisé dans la moelle épinière au niveau de la corne intermédio-latérale, et son axone se projette sur les ganglions sympathiques. Le neurone postganglionnaire innerve quant à lui les cellules osseuses. Les fibres afférentes sensitives qui innervent les os des membres ont leurs corps cellulaires dans les ganglions spinaux. Ces fibres pénètrent dans la moelle épinière par la racine dorsale et établissent une synapse avec un interneurone, ou directement avec un neurone moteur du système sympathique.

Les fines terminaisons nerveuses qui ciblent le squelette sont principalement composées d'axones de petit et de moyen diamètre, à la fois non myélinisées et myélinisées. Elles peuvent être classées en sous-populations en fonction des marqueurs qu'elles expriment, ce qui permet leur visualisation par les méthodes d'immunohistochimie ou d'immunofluorescence.

1.4.2.1. Les neurones sensoriels innervant les os.

Les neurones sensoriels innervant les os ont leurs corps cellulaires dans les ganglions de la racine dorsale (DRG pour *Dorsal Root Ganglion*), le long de la moelle épinière pour le squelette thoracique et appendiculaire, ou dans les ganglions des nerfs crâniens pour le squelette crânio-facial. Ils sont de morphologie pseudo-unipolaire. Le neurone étend un axone qui bifurque en une projection centrale vers le cerveau et une projection périphérique qui innerve l'os. Lors d'une lésion, les neurones vont libérer des neuropeptides tels que le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP) et de la substance P (SP) qui favorisent respectivement la vasodilatation et l'extravasation plasmatique ainsi qu'une modulation locale de l'immunité (Chiu *et al*. 2012).

Les axones des neurones sensoriels présents dans l'os sont majoritairement sous forme de petites fibres non myélinisées de 0,2 à 1,5 µm de diamètre, ou de fibres myélinisées moyennes de 1 à 5 µm de diamètre (Figure 20) exprimant le neurofilament (NF). Les axones de grand diamètre sont généralement absents de la moelle osseuse, mais sont présents dans les mâchoires et le périoste des os longs.

Il a été montré que le CGRP stimule les ostéoblastes tout en inhibant la différenciation et la fonction des ostéoclastes (Grässel 2014). La substance P peut stimuler la formation osseuse lorsqu'elle est présente à des concentrations élevées, mais elle est capable également de réguler la résorption osseuse à des concentrations plus faibles (Zheng *et al*. 2016).

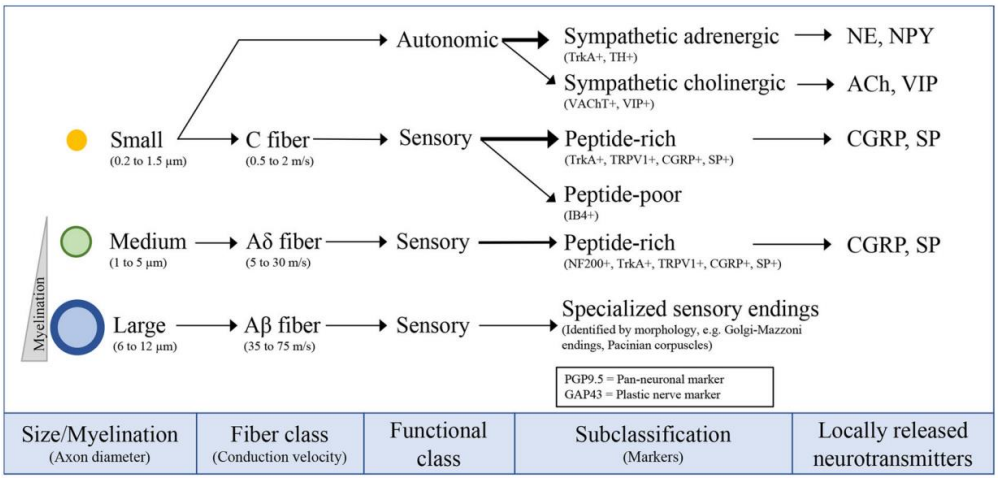


Figure 20 : Classification des axones présents dans l'os selon leur diamètre (Brazill *et al*. 2019).

Les neurones sensoriels expriment les neuropeptides CGRP et SP alors que les neurones sympathiques expriment NE, NPY, ACh et VIP. **TrkA** = récepteur tyrosine kinase neurotrophique de type 1, **TH** = Tyrosine Hydroxylase, **VIP** = peptide intestinal vasoactif, **ACh** = acétylcholine, **CGRP** = peptide lié au gène de la calcitonine, **SP** = substance P et **NF** 200 = neurofilament, NE = norepinephrine.

1.4.2.2. Les neurones autonomes sympathiques innervant les os.

Dans le cas des nerfs sympathiques, le système nerveux autonome envoie des informations aux tissus périphériques par l'intermédiaire de deux types de neurones. Le premier est un neurone préganglionnaire dont le corps cellulaire est localisé dans la moelle épinière. Il reçoit l'information du système autonome et la transmet au corps cellulaire d'un neurone ganglionnaire dont le corps cellulaire est localisé dans un ganglion qui lui-même innerve le tissu cible.

Les neurones ganglionnaires sont identifiés par la présence de petits neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine (ACh), la noradrénaline (NE), le neuropeptide Y (NPY) ou le peptide intestinal vasoactif (VIP). Le marquage de la Tyrosine Hydroxylase (TH), enzyme limitant la vitesse de synthèse de la NE (principal neurotransmetteur sympathique) ainsi que du récepteur tyrosine kinase neurotrophique de type 1 (TrkA) sont souvent utilisés pour mettre en évidence les fibres sympathiques.

1.4.2.3. Localisation des nerfs dans l'os.

Les fibres nerveuses sensorielles et autonomes pénètrent l'os cortical aux côtés des vaisseaux sanguins par les canaux de Volkmann et de Havers. Dans ces canaux, les fibres nerveuses sensorielles sont généralement linéaires alors que les fibres autonomes s'enroulent autour des vaisseaux (Figure 21). Si

on considère le nombre de fibres par zone, le plus grand nombre de fibres a été retrouvé dans le périoste (177 fibres sensorielles positives au CGRP/mm^2 et 154 fibres sensorielles myélinisées positives au NF/mm^2). Elles sont nettement moins abondantes dans l'os minéralisé (15 fibres CGRP$^+$/mm^2 et 8 fibres NF$^+$/mm^2) et dans la moelle osseuse (10 fibres CGRP$^+$/mm^2 et 3 fibres NF$^+$ /mm^2) (Brazill *et al*. 2019). Bien qu'une variation de la densité des fibres neurales dans une même zone existe, la diaphyse présente néanmoins le plus petit nombre de fibres.

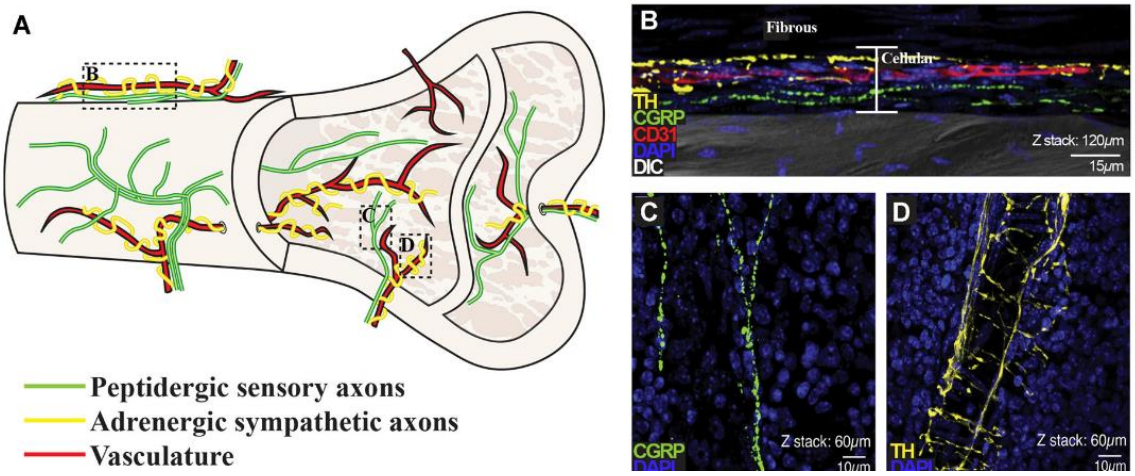


Figure 21 : Répartition des axones neuronaux dans l'os, d'après (Brazill *et al*. 2019).

(**A**) Distribution des nerfs sensoriels et autonomes dans l'os. (**B**) Périoste de fémur de souris après immunomarquage des fibres nerveuses sympathiques par la TH (jaune), des fibres nerveuses sensorielles par le CGRP (vert), des vaisseaux sanguins par le CD31 (rouge) et des noyaux par le DAPI (bleu). (**C** et **D**) Immunomarquage TH, CGRP, CD31 et DAPI dans la moelle osseuse.

Les fibres sensorielles et sympathiques établissent un contact de type « synapse » avec les cellules osseuses qui présentent des récepteurs pour les substances libérées par les fibres neurales. La communication intercellulaire est difficile à analyser dans les tissus durs *in situ*, et il n'y a à ce jour que peu de preuves directes du type de connexion entre les fibres nerveuses et les cellules osseuses. Néanmoins les fibres nerveuses longent les vaisseaux sanguins et sont situées à proximité des cellules hématopoïétiques et des cellules osseuses (Serre *et al*. 1999). Dans des modèles de co-culture *in vitro* de neurones sensoriels et d'ostéoblastes il a été montré qu'un contact étroit de type synapse était établi (Asada *et al*. 2012). Par ailleurs cette communication est bidirectionnelle. Les terminaisons des neurites périphériques libèrent du glutamate et de la substance P par exocytose (signal efférent aux ostéoblastes) et les ostéoblastes libèrent de l'adénosine triphosphate ou ATP (signal afférent aux neurites). Les neurones sensoriels ont donc la capacité à transmettre les informations de charge mécanique au cerveau pour moduler l'homéostasie osseuse.

1.5. Remodelage osseux physiologique.

L'os se renouvelle continuellement tout au long de la vie. Chaque année, environ 10% du volume total du squelette est remodelé (Manolagas 2000). C'est majoritairement l'os trabéculaire qui est renouvelé à 25%, contre seulement 3% de l'os cortical (Hardy & Cooper 2009). Ce remodelage est nécessaire car il permet à l'os de s'adapter aux contraintes environnementales, notamment aux contraintes mécaniques dues à l'activité physique.

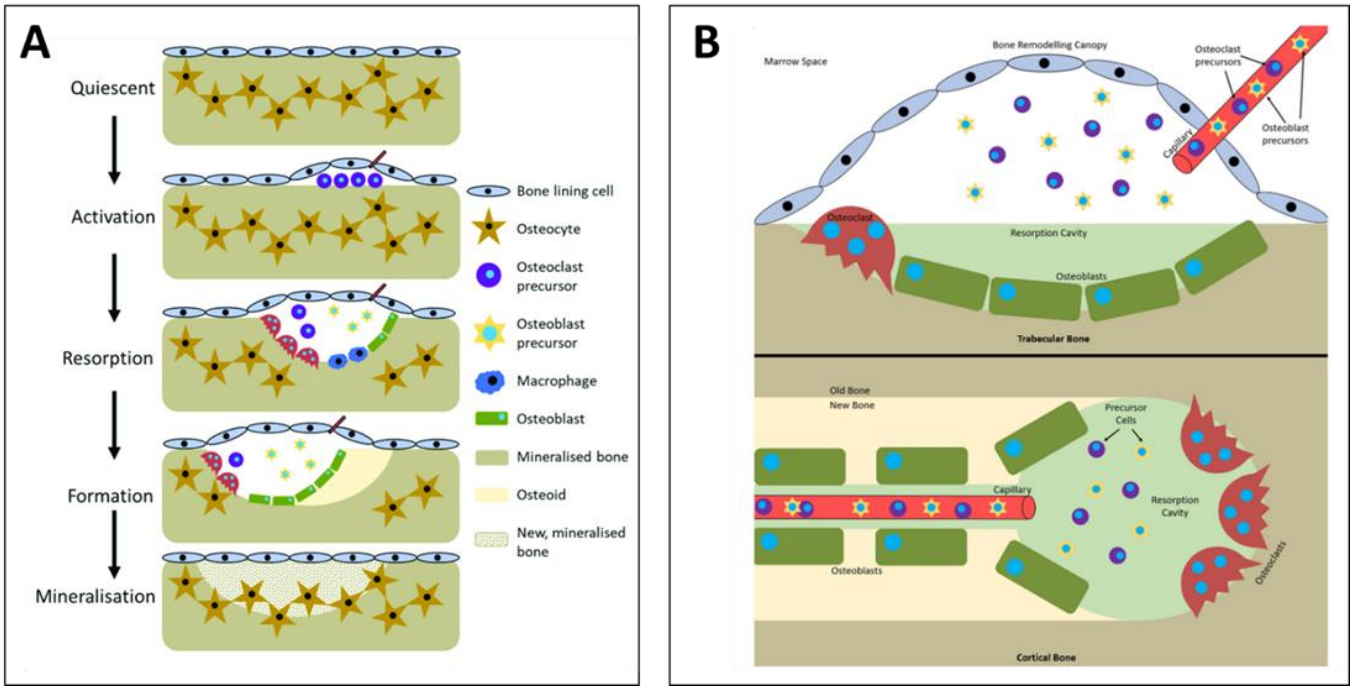


Figure 22 : Principales étapes du remodelage osseux (A) et unités multicellulaires osseuses (BMU) (B) dans l'os trabéculaire (haut) et cortical (bas) (Owen & Reilly 2018).

Le remodelage osseux est composé de 5 étapes successives que sont la phase de quiescence, d'activation, de résorption, de formation et de minéralisation osseuse. Les BMU s'initient dans l'os trabéculaire sous des auvents de remodelage osseux formés à partir de cellules de revêtement osseux, et dans l'os cortical à des points situés dans les canaux de Havers.

Le remodelage osseux est composé de 5 phases consécutives dites de quiescence, d'activation, de résorption, de formation et de minéralisation (Figure 22A). Brièvement, dans la phase de quiescence, qui correspond à un état d'équilibre, les cellules de remodelage osseux sont au repos. S'ensuit une phase d'activation dans laquelle des pré-ostéoclastes sont recrutés, puis ils se différencieront en ostéoclastes et auront accès à la zone de résorption.

La phase de résorption débute lorsque les ostéoclastes éliminent l'os ancien, et ce processus dure 2 à 4 semaines à une vitesse de 25 µm/jour (Jilka 2003). Les ostéoclastes créent un microenvironnement acide dans lequel ils relarguent des ions H^+, ce qui va former des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship. Ils sécrètent des enzymes telles que de la « *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase* » (TRAP) et des métalloprotéases comme la « *Matrix Metalloproteinase 9* » (MMP9). Des macrophages

sont présents et préparent la surface de l'os, ils produisent à leur tour des cytokines qui stimulent la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes et migrent vers ces lacunes (Hadjidakis & Androulakis 2006).

Lors de la phase de formation osseuse, les ostéoblastes déposent une couche de matrice osseuse non minéralisée appelée ostéoïde, qui sera minéralisée dans un second temps. Les ostéoblastes vont au fur et à mesure être piégés dans la matrice minéralisée et devenir des ostéocytes. Au bout de 10 jours de formation osseuse, environ 70 % de la minéralisation finale de cette partie d'os est réalisée et elle se poursuit pendant plusieurs mois.

Les ostéoblastes et les ostéoclastes travaillent donc de manière synchronisée, respectivement dans la formation et la résorption osseuse. Ils s'organisent en unités fonctionnelles de remodelage ou « *Basic Multicellular Units* » (BMU) (Figure 22B) et sont accompagnés d'un apport sanguin et de tissu conjonctif de soutien (Jilka 2003). Les BMU forment et remplissent des tunnels à travers l'os cortical et l'os trabéculaire. Les ostéoclastes se trouvent à l'avant, formant le cône de résorption des BMU trabéculaires, avec des ostéoblastes derrière formant le cône de fermeture. La BMU peut se déplacer dans les trois axes dans les BMU corticales, et dans les deux axes dans les BMU trabéculaires, étant donné qu'ils se trouvent à la surface osseuse.

L'équilibre entre la création et la dégradation osseuse doit être finement régulé tout au long de ce processus. S'il n'est plus respecté, des états pathologiques apparaissent. À titre d'exemple, l'excès de formation osseuse peut induire des pathologies telles que des ostéopétroses, alors que l'excès de dégradation osseuse peut provoquer de l'ostéoporose.

Cette activité de remodelage osseux intervient également dans le cas de la réparation de fractures osseuses de petit volume. Cette partie sera développée dans le paragraphe suivant.

II. Stratégies de réparation osseuse.

L'os est capable de se réparer naturellement après des lésions de petit volume, mais dans le cas de physiopathologies osseuses (traumatismes sévères, infections, sarcomes, chirurgie réparatrice), ou encore lorsque le volume de la lésion osseuse est de taille critique, une réparation totale de la lésion n'est pas possible.

En 2019, 178 millions de fractures osseuses ont été dénombrées dans le monde, et 455 millions de personnes souffraient de pathologies associées à une mauvaise réparation osseuse (Wu *et al*. 2021). Compte tenu du vieillissement de la population, la prise en charge des traumatismes osseux est ainsi devenue un enjeu majeur de santé publique.

2.1. Incidence des fractures osseuses.

L'incidence des fractures osseuses augmente avec le vieillissement de la population, et touche plus particulièrement les femmes ménopausées de plus de 50 ans. L'œstrogène est le principal régulateur hormonal du métabolisme osseux, il permet d'inhiber le remodelage et la résorption osseuse (Khosla *et al*. 2012). Or, à la ménopause la production d'œstrogènes diminue de façon drastique et leur effet inhibiteur sur les ostéoclastes n'est plus observé. S'ajoute à cela l'ostéoporose qui est une pathologie osseuse souvent associée à la vieillesse dans laquelle la densité osseuse est diminuée, augmentant *de facto* le risque de fractures.

Almigdad et ses collaborateurs (Almigdad *et al*. 2022) ont comparé les fractures osseuses en fonction du mécanisme de la blessure, du sexe et de l'âge. Ils ont montré que ce sont les hommes adultes de moins de 50 ans qui sont les plus victimes de fractures, celles-ci étant dites de haute énergie car correspondant dans la majorité des cas à des chutes de hauteurs élevées ou à des accidents de la route. *A contrario*, les femmes de plus de cinquante ans sont plus sujettes aux blessures de faible énergie correspondant à des chutes simples. Ils ont montré que les os les plus fracturés chez les hommes sont l'omoplate, la clavicule, l'humérus et la diaphyse des os longs. En revanche, les femmes avaient une fréquence plus élevée de fractures de l'humérus et du fémur. Par ailleurs, le tabagisme, la consommation excessive d'alcool et l'obésité sont des facteurs aggravant les risques de fractures (Kaastrup & Grønbæk 2021).

À ce jour il n'existe pas de définition claire d'un défaut de « taille critique ». Les orthopédistes considèrent un défaut critique comme une fracture qui ne guérirait pas spontanément malgré une stabilisation chirurgicale. Ces fractures nécessitent la mise en place d'une greffe osseuse (Nauth *et al*. 2018). En général, on parle de défaut de taille critique lorsqu'une fracture fait environ 2 cm de long chez l'Homme, ou est supérieure à 50 % de la perte de la circonférence osseuse (Keating *et al*. 2005).

Toutefois, ces valeurs dépendent de la localisation anatomique du défaut et de l'état des tissus mous à la périphérie de la fracture.

2.2. Réparation des fractures osseuses.

2.2.1. Les fractures osseuses.

Une fracture osseuse correspond à une perte de la continuité anatomique de l'os qui se traduit par une instabilité mécanique. Plus de 1500 types de fractures ont été répertoriées et une classification selon une nomenclature codée a été adoptée (Müller *et al*. 1990). Afin de faciliter la prise en charge, elles sont classées selon leur localisation et leur morphologie.

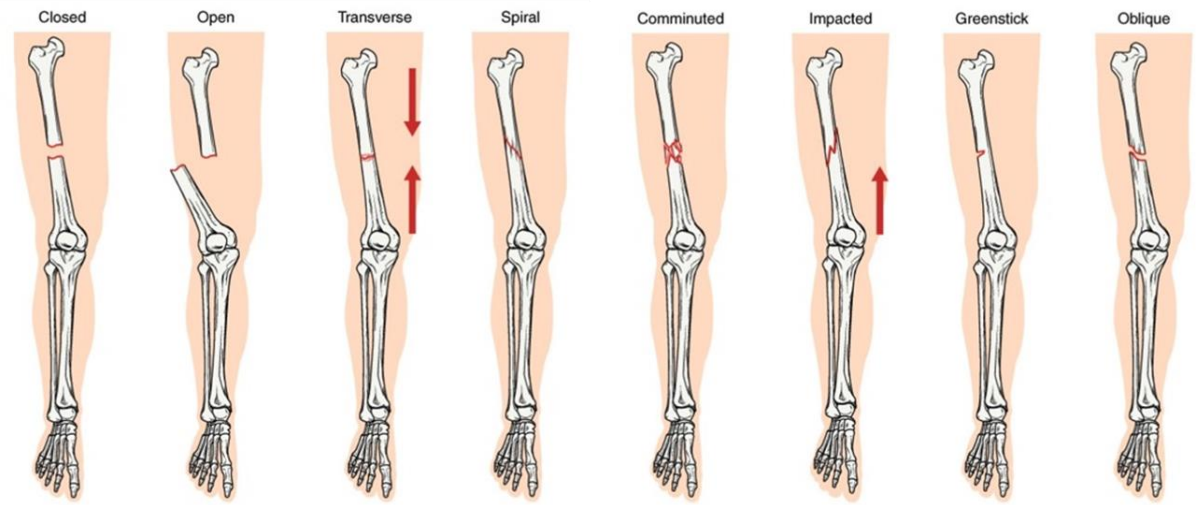


Figure 23 : Principaux motifs de fractures permettant de les classer (Lecturio 2023).
Les flèches indiquent le sens de la force appliquée amenant à la fracture.

Brièvement, les fractures sont essentiellement classées en « fractures fermées » (pas de rupture cutanée) ou « fractures ouvertes » (rupture cutanée). Les fractures ouvertes sont toujours associées à des dommages plus importants des tissus mous environnants, y compris au niveau de la membrane périostée. Le risque d'infection associé est plus élevé, et le développement de pathologies associées à l'absence de réparation, telles que les pseudarthroses, sont plus importantes dans les fractures ouvertes.

2.2.2. Réparation des fractures en conditions physiologiques.

La réparation osseuse est influencée par des facteurs mécaniques et biologiques. Elle varie selon la zone de la fracture et l'âge de l'individu. Les fractures en zone métaphysaire, riche en os spongieux, se consolident plus rapidement que les fractures diaphysaires composées essentiellement d'os cortical. Chez l'enfant, la consolidation met 6 à 8 semaines, alors qu'elle est plus longue chez l'adulte, de 3 à 6 mois. En cas d'immobilisation insuffisante, la consolidation de la fracture peut être retardée. Par ailleurs, si les fragments osseux sont maintenus écartés l'un de l'autre, la réparation est alors impossible.

2.2.2.1. La phase inflammatoire - hématome fracturaire.

Un hématome dit fracturaire se développe dans les premières 24 h suivant l'apparition d'une fracture et peut durer jusqu'à 7 jours. Cet hématome est associé à la rupture des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses provoquant une hémorragie locale. Les cellules endommagées libèrent des cytokines. Les cellules immunitaires (principalement les macrophages) ainsi que des molécules permettant le recrutement des précurseurs des ostéoclastes vont alors être mobilisés. Les ostéoclastes vont résorber l'os afin d'aplanir les extrémités osseuses fracturées et un tissu fibrovasculaire de type granuleux va se former.

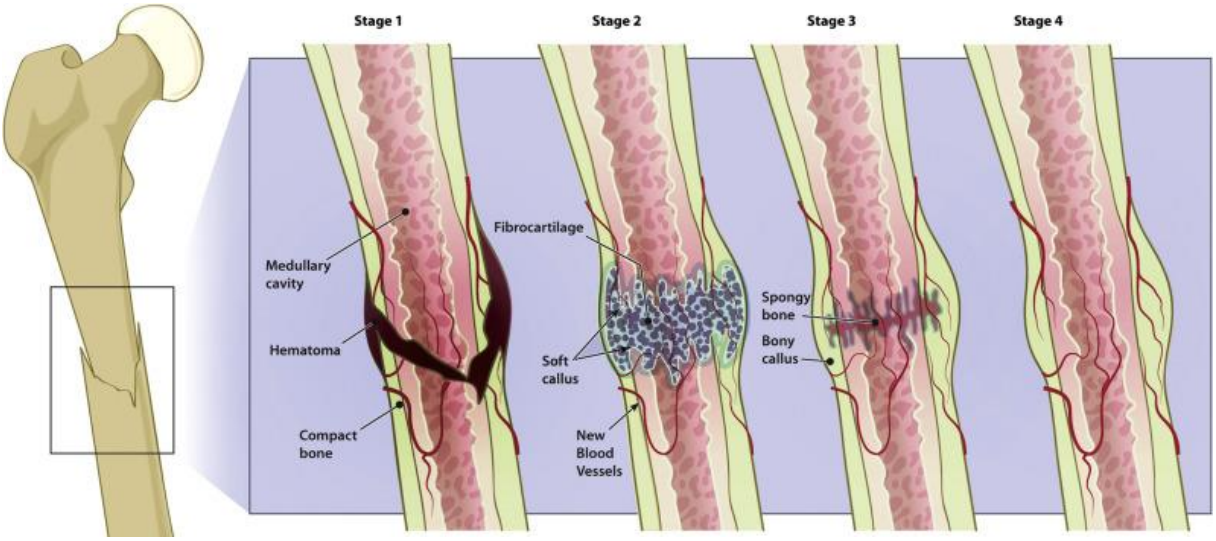


Figure 24 : Principales étapes de la réparation des fractures (Li, Kacena, *et al*. 2019).

Étape 1 : Après une fracture, un hématome se forme suite à la rupture des vaisseaux. Étape 2 : Les cellules progénitrices du périoste et de la moelle vont se différencier en ostéoblastes. L'environnement au site de fracture étant hypoxique, les cellules progénitrices subissent une chondrogenèse. Étape 3 : Les ostéoblastes forment de l'os fibreux sur la matrice calcifiée. Étape 4 : Le processus de remodelage se poursuit avec des ostéoclastes et des ostéoblastes facilitant la conversion de l'os fibreux en os lamellaire. La continuité anatomique est finalement recréée.

2.2.2.2. La phase du cal fibro-cartilagineux – formation de tissu ostéoïde.

7 à 15 jours après la fracture, les chondrocytes synthétisent un tissu fibro-cartilagineux riche en collagène. Les cellules ostéoinductrices et ostéoformatrices sont alors recrutées vers le jour 15. Les ostéoblastes, qui ont remplacé les fibroblastes, élaborent une matrice organique appelée substance ostéoïde qui crée un pont autour de la fracture, appelé « cal », qui vient la stabiliser. La substance ostéoïde va peu à peu se minéraliser grâce à l'activité des ostéoblastes. Les néo-vaisseaux formés vont bourgeonner des bords vasculaires vers le centre de la fracture.

2.2.2.3. La phase du cal osseux dur.

La minéralisation du cal se poursuit de 3 semaines à 2 ou 3 mois après la fracture jusqu'à envahir la totalité du cal fibreux. Celui-ci se résorbe, laissant place à un cal osseux qui prend progressivement la forme initiale de l'os avant la fracture. En situation pathologique (discuté paragraphe 2.3. « *Cas des*

fractures non réparées »), le cal osseux ne se résorbe pas. Chez la souris, la réparation complète d'une fracture « de fatigue » sur l'ulna a montré que le cal dur était à son épaisseur maximale après 14 après jours. Le suivi par tomographie aux rayons X est présenté Figure 25.

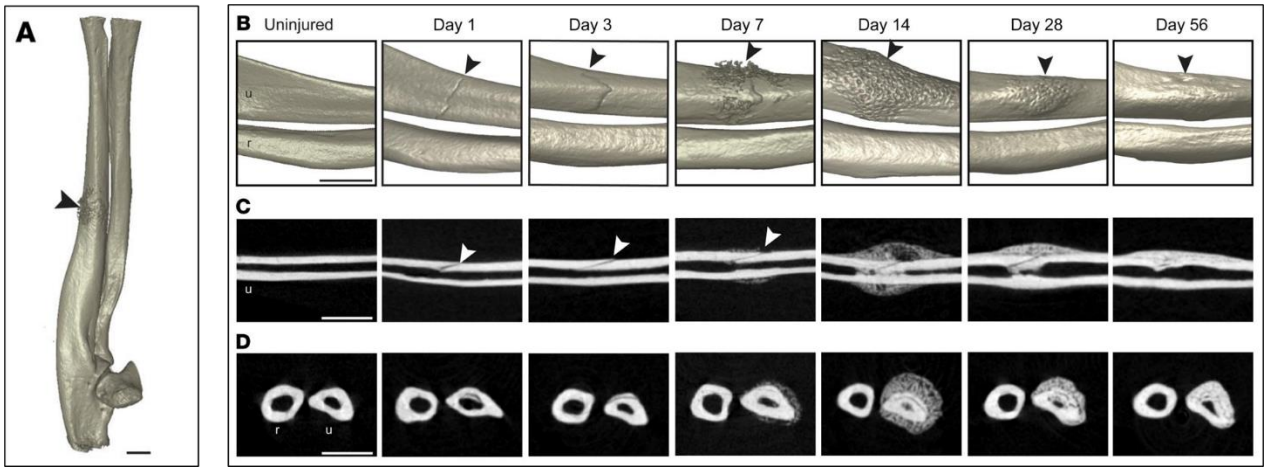


Figure 25 : Suivi de la réparation d'une fracture « de fatigue » chez la souris par micro-CT (Li, Meyers, *et al*. 2019).

Des fractures « de fatigue » ont été induites au niveau de l'ulna chez des souris, et la reconstruction osseuse a été suivie par micro-CT. (**A**) Les reconstructions 3D micro-CT d'une fracture à jour 7. (**B**) Suivi de la réparation de fracture du jour 1 au jour 56, (**C**) images en coupe coronale et (**D**) coupes axiales illustrent la chronologie normale de la guérison des fractures de stress sur une période de 56 jours. Barre d'échelle : A et B = 500 µm, C et D = 1 mm. Les pointes de flèche indiquent les sites de fracture.

2.2.2.4. La phase de remodelage dans un os néoformé.

Progressivement, l'intégrité tissulaire est retrouvée grâce à la formation du cal osseux. Le tissu osseux primaire est remplacé par du tissu osseux secondaire lamellaire. Le remodelage final redonne à l'os sa forme et ses propriétés avec un réseau vasculaire et nerveux fonctionnel. Cette étape est longue et peut durer de 1 à 4 ans.

Bien que pendant de nombreuses années l'immobilisation des os après une fracture ait été privilégiée, de plus en plus d'études montrent que la stimulation mécanique permet d'améliorer la reconstruction osseuse. En effet, il a été montré que les contraintes mécaniques sont nécessaires à la réparation osseuse en permettant la stimulation de l'ostéoformation. *A contrario* et à titre d'exemple, l'absence de contraintes lors de la perte de dents entraîne une résorption osseuse de l'os alvéolaire correspondant à un tiers du volume de la paroi osseuse (Nevins & Mellonig 1994).

2.2.3. Rôle de l'innervation dans la réparation des fractures.

Suite à une fracture osseuse, une germination nerveuse est observée (Figure 26A), y compris dans des zones peu innervées en conditions physiologiques.

Dès la phase inflammatoire, une expression accrue de « *nerve growth factor* » (NGF) dans le cal a été observée, ce qui entraîne une douleur osseuse. Le pic d'expression de NGF, majoritairement exprimé par les ostéoblastes, a été retrouvé au jour 3 suivant la fracture (Li, Meyers, *et al*. 2019). L'application du NGF de manière topique dans un défaut osseux permet une surexpression de VEGF, démontrant que le NGF favorise l'angiogenèse (Chen *et al*. 2015).

Le NGF va également favoriser la croissance des fibres nerveuses $CGRP^+$ et TH^+ (Figure 26 B). Il a été montré que le CGRP joue un rôle essentiel dans la réparation osseuse. En son absence, la régénération osseuse est altérée : le nombre d'ostéoblastes est réduit et le cal osseux ne se forme pas, ce qui conduit le plus souvent à une absence d'union des sites fracturaires (Appelt *et al*. 2020).

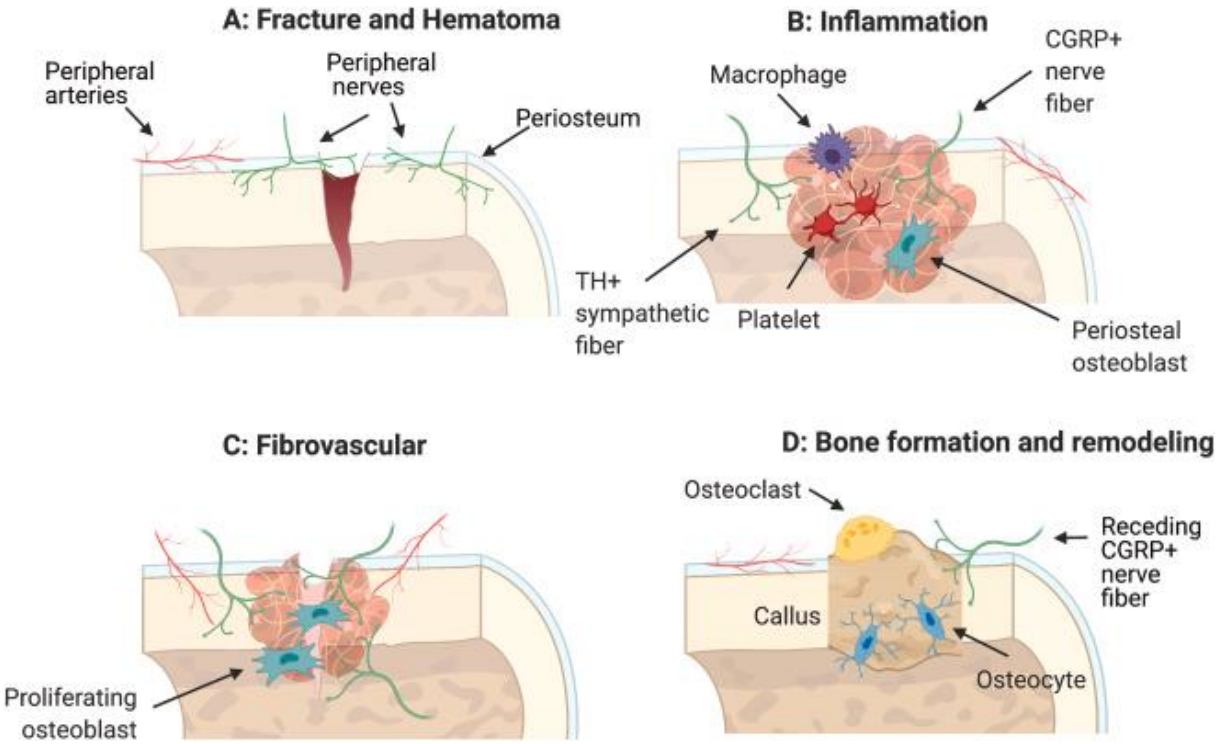


Figure 26 : Implication des nerfs dans la cicatrisation des fractures (Rajpar & Tomlinson 2022).

(**A**) La fracture entraîne la rupture et le saignement des vaisseaux marqués par un hématome. (**B**) En phase inflammatoire, les nerfs sensitifs $CGRP^+$ et sympathiques TH^+ innervent d'abord le cal à partir du périoste. (**C**) Dans la phase fibro-vasculaire, la densité nerveuse augmente dans le cal et les nerfs sont étroitement associés aux vaisseaux incarnés. (**D**) La formation osseuse est caractérisée par un cal cartilagineux « mou » au site de la lésion et des réductions marquées de la densité nerveuse. L'os est remodelé pour retrouver sa structure et sa fonction d'origine.

Les fibres nerveuses sensorielles vont stimuler l'ostéoblastogénèse (Figure 26C) mais les messagers secondaires responsables du recrutement ne sont à ce jour pas encore identifiés. Une fois l'os réparé, l'expression des neuropeptides diminue et les fibres $CGRP^+$ se rétractent (Figure 26D).

L'innervation et le relargage des neuropeptides sont essentiels à la réparation des fractures. Leur absence conduit à une altération de la formation des cals, à une différenciation diminuée du fibro-cartilage et à la formation d'un tissu osseux mécaniquement faible (Niedermair *et al*. 2014). Par

ailleurs, des travaux ont montré que la SP seule permet une ossification hétérotopique (Tuzmen *et al*. 2018).

Pour conclure, un modèle temporel de la réparation des fractures (Figure 27) a été proposé par Li et ses collaborateurs (Li, Meyers, *et al*. 2019). Dans un modèle murin une fracture « de fatigue » a été réalisée sur l'ulna, sans induire de rupture nerveuse. Il a été montré que l'innervation précède à la fois la vascularisation, l'ossification et la minéralisation. Des fibres nerveuses apparaissent dans les zones de chondrogenèse avec un pic au jour 3 post-fracture. Celles-ci vont se rétracter au fur et à mesure de la réparation osseuse. Cette innervation du site lésé va s'accompagner de la vascularisation avec un maximum au 7ème jour. Les ostéoprogéniteurs amenés par la vascularisation vont permettre à la fois une ossification et une minéralisation de la fracture. Bien que ce modèle ait été établi en absence de dénervation associé à la fracture, la séquence des événements suite à une étape de dénervation est probablement identique mais peut être temporellement retardée.

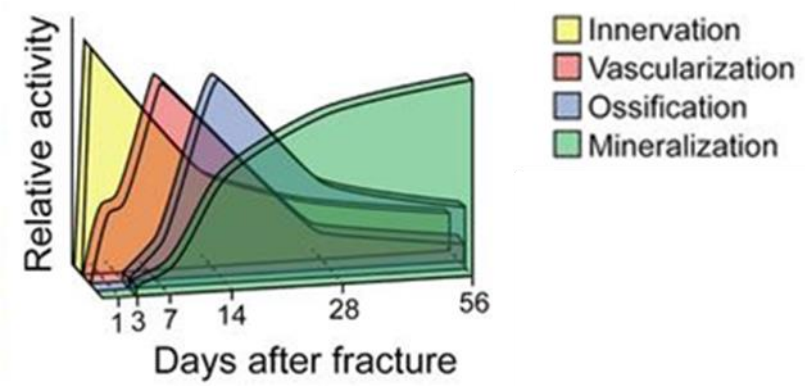


Figure 27 : Modèle schématique de la séquence temporelle des événements après une fracture (Li, Meyers, *et al*. 2019).

Le nombre de jours après la fracture est représenté sur l'axe des x et l'activité relative de chaque processus cellulaire est représentée sur l'axe des y. L'innervation est le premier processus impliqué, les nerfs sensoriels vont guider la vascularisation, et l'ossification puis la minéralisation vont se mettre en place.

2.3. Cas des fractures non réparées.

Lorsque les fractures ne se réparent pas, elles sont associées à des douleurs intenses, souvent chroniques. Les lésions nerveuses associées peuvent alors induire des changements de structure de l'os (Br Med J 1955) conduisant à des pathologies.

2.3.1. Pathologies associées à une réparation insuffisante des fractures.

Une réparation incomplète associée à un défaut de taille critique a pour conséquence d'entraîner la persistance d'un cal osseux. D'autres complications telles qu'une hémorragie, une thrombose, une réponse inflammatoire systémique ou une infection peuvent survenir, pouvant aboutir au décès du patient (Baker *et al*. 2018).

Lorsque les extrémités de la fracture ne sont pas unies, des pathologies ostéoarticulaires peuvent survenir (Figure 28). Les pseudarthroses hypertrophiques sont les plus courantes. Dans ce cas l'apport sanguin est adéquat mais une formation excessive de cal osseux qui ne se résorbe pas persiste et induit une instabilité mécanique. Les pseudarthroses oligotrophes sont suffisamment irriguées par le système sanguin mais peu ou pas callosités sont formées. Les pseudarthroses atrophiques ne sont pas viables en raison d'un faible apport sanguin, et nécessitent une intervention chirurgicale et le recours à une greffe osseuse. D'autres types de pseudarthroses peuvent se développer comme les pseudarthroses synoviales caractérisées par un liquide inflammatoire formant une pseudocapsule synoviale.

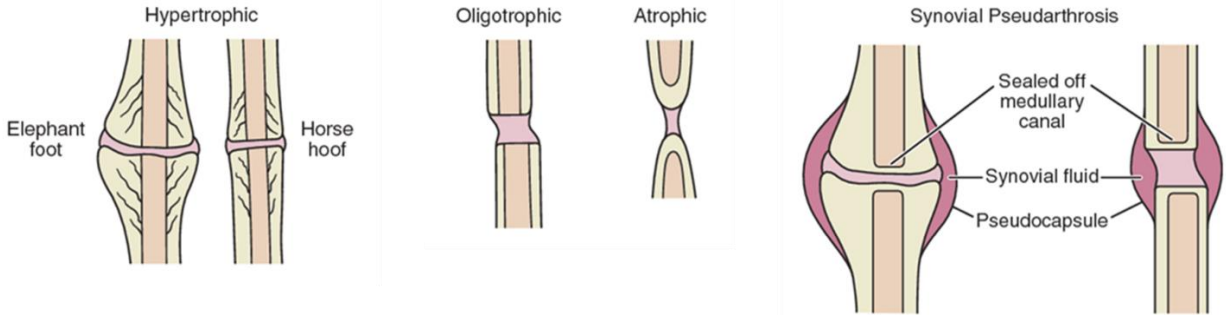


Figure 28 : Pathologies associées à des fractures non réparées, adaptée de Brinker and O'connor 2007.

2.3.2. Inflammation chronique au site de fracture non réparé.

En cas de fracture osseuse non réparée, une inflammation chronique peut apparaître. Chartier et ses collaborateurs (Chartier *et al*. 2014) ont montré que chez des souris présentant des fractures non cicatrisées, on observe une germination exubérante des nerfs sensoriels et sympathiques, une augmentation de la densité des fibres nerveuses et la formation de structures ressemblant à des névromes (compression des nerfs) au site de la fracture (Figure 29).

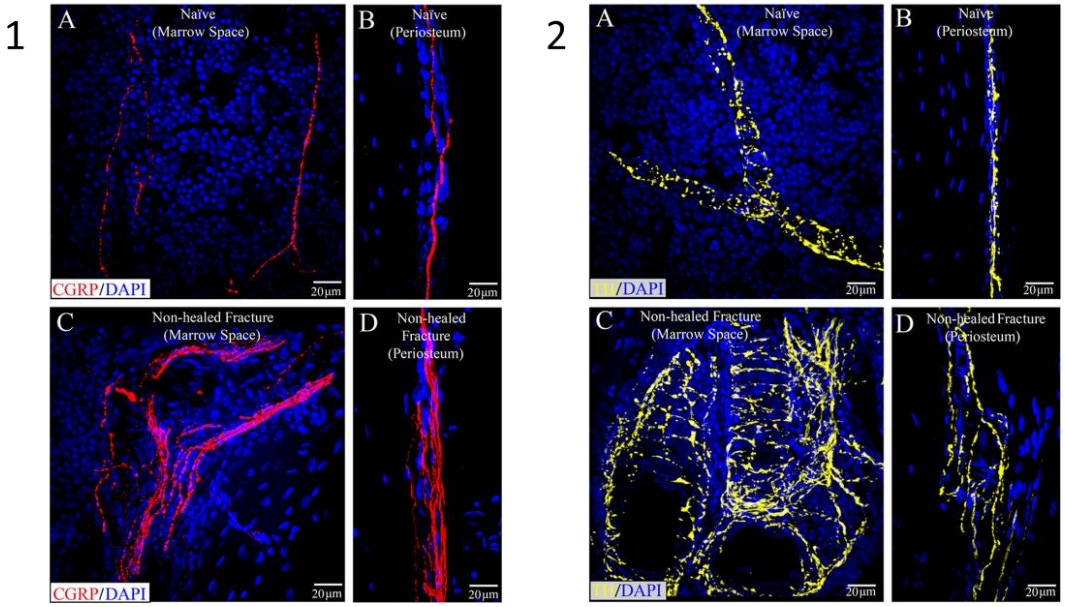


Figure 29 : Expansion des fibres nerveuses sensorielles (1) et sympathiques (2) dans des fractures non réparées (Chartier *et al*. 2014).

Pour analyser le remodelage des fibres nerveuses lors des lésions osseuses, des fractures fermées du fémur ont été réalisées sur des souris mâles adultes, et des broches intramédullaires ont été insérées (réparation orthopédique). Le groupe contrôle, dit naïf, n'a pas subi de fractures (**A** et **B**). A 90 jours post-opération les fractures n'ont pas été réparées (**C** et **D**) et des analyses histologiques ont été réalisées. Immunomarquage du CGRP pour les nerfs sensoriels (rouge) et tyrosine hydroxylase (TH en jaune) pour le nerf sympathique. Marquage des noyaux cellulaire par le DAPI (bleu). Echelle = 20 µm.

Il semblerait que ce soit le CGRP, en tant que neurotransmetteur clé dans la transmission de la douleur, dans la sensibilité à la douleur, et dans l'inflammation (Russell *et al*. 2014), qui joue un rôle central dans ces mécanismes. À l'aide de modèles de culture *in vitro*, il a été montré que le CGRP augmente la prolifération et réduit l'apoptose des cellules ostéoprogénitrices (Mrak *et al*. 2010). Il permet de stimuler l'expression des marqueurs ostéogéniques et l'activité des ostéoblastes.

L'effet de la supplémentation locale en CGRP pour la régénération osseuse dans un modèle d'ostéogenèse par distraction chez le rat a été étudié par Xu et ses collaborateurs (Xu *et al*. 2020). Ils ont émis l'hypothèse que le CGRP améliorerait l'angiogenèse dans le comblement osseux en ciblant les cellules progénitrices endothéliales. Ils ont montré que l'administration locale de CGRP permet d'augmenter la population de cellules progénitrices endothéliales, de stimuler la formation de vaisseaux et d'améliorer la régénération osseuse.

Néanmoins, ces facteurs neurotrophiques administrés localement sur les sites lésés peuvent également être véhiculés par différents types de vecteurs dont les biomatériaux ou les « substituts osseux ». Le développement de ces substituts reste un véritable défi en bioingénierie et a, depuis de nombreuses années, suscité d'importants travaux associant la chimie des matériaux et la biologie du vivant.

III. Les substituts pour la réparation osseuse.

Nous avons montré que les pertes massives de tissu osseux ne peuvent pas être réparées sans avoir recours à des greffes osseuses ou à l'utilisation de substituts. Les greffons peuvent provenir du patient (autogreffe), d'un autre patient (allogreffe), d'animaux (xénogreffe), ou être d'origine synthétique.

Néanmoins, la quantité d'os disponibles reste limitée pour les autogreffes, et des risques immunologiques sont associés aux allo et xénogreffes. Ces limites ont conduit au développement de nombreux substituts pour pallier ces inconvénients.

Il existe de nombreux matériaux développés pour la réparation osseuse, et ceux-ci permettent d'améliorer la qualité de vie de millions de patients. Les matériaux utilisés pour le comblement osseux doivent répondre à un cahier des charges très précis et qui sera développé dans le paragraphe 3.2.1.

3.1. Les greffes osseuses.

3.1.1. Les greffes osseuses autologues.

Le greffon osseux autogène provient du patient lui-même. La première greffe osseuse autogène documentée date de 1821, et a été réalisée par Philip von Walter. Ce type de greffon a l'avantage d'être ostéogénique, ostéoinducteur et ostéoconducteur. C'est la technique de référence lorsque le prélèvement est possible. Toutefois ce type de greffon a le désavantage de nécessiter deux interventions chirurgicales, l'une au site de prélèvement et la seconde au site receveur. Par ailleurs, le greffon doit être prélevé le jour de l'intervention dans des conditions stériles.

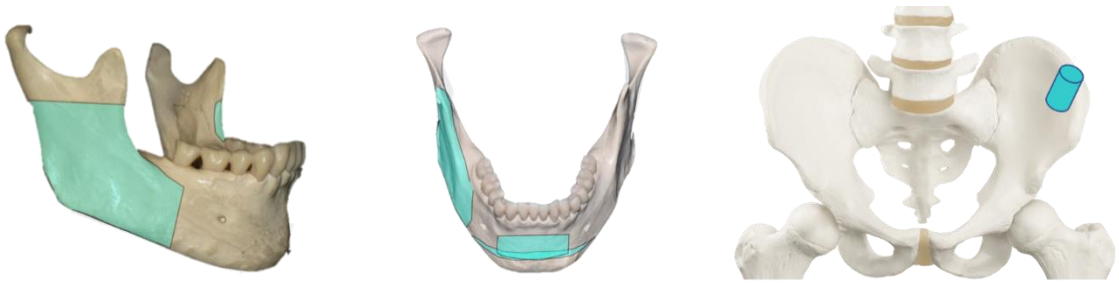


Figure 30 : Principaux sites de prélèvements d'os autogènes, adapté de Ernenwein 2012.
La région molaire, la symphyse mentonnière et l'os de la crête iliaque sont les parties d'os les plus utilisées pour les autogreffes et sont représentées en bleu.

Plusieurs sites de prélèvement sont possibles. Selon les applications cliniques ciblées, les principaux sont la région molaire ou la symphyse mentonnière dans la mandibule, au niveau de l'os crânien pariétal, ou encore de la crête iliaque (Figure 30). Les greffes autogènes sont plébiscitées par l'absence de risque de réactions croisées ou de rejet étant donné que le greffon a la même origine que le site receveur.

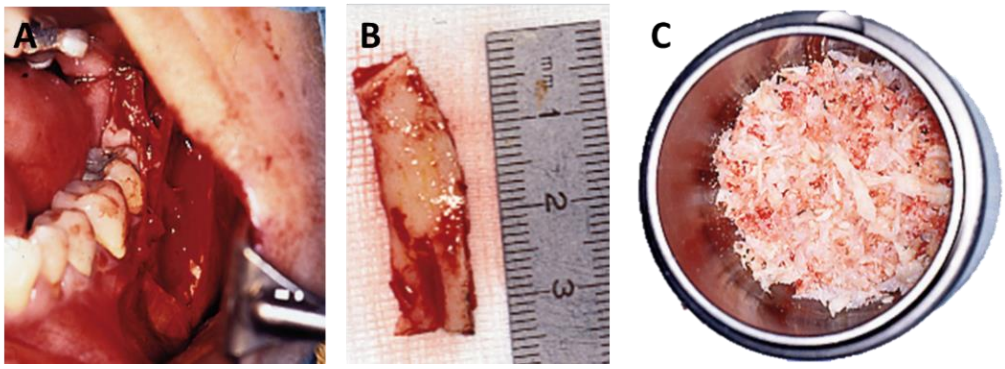


Figure 31 : Récupération d'un greffon autologue dans la mandibule (Seban 2008).
(**A**) Site donneur après prélèvement d'os mandibulaire. (**B**) Monobloc osseux mandibulaire cortico-spongieux. (**C**) L'os mandibulaire est broyé avant d'être appliqué comme greffon.

À l'heure actuelle, l'autogreffe est essentiellement utilisée pour des réparations osseuses en chirurgie maxillofaciale, pour combler le manque d'os alvéolaire suite aux extractions dentaires. La qualité de l'os prélevé peut être altérée avec l'âge du patient, notamment s'il souffre d'ostéoporose, ce qui est une autre limite de cette stratégie.

3.1.2. Les greffes osseuses allogéniques.

Les greffons allogéniques sont prélevés chez un autre individu de la même espèce. Ils sont principalement ostéoconducteurs. Une fois prélevé sur un donneur, l'os va subir des traitements visant à garantir sa biocompatibilité et la sécurité du patient. Ces greffes qui proviennent de banques d'os allogéniques peuvent être sous forme de particules ou de blocs.

En France, il existe des banques de tissus osseux (BIOBank) dans lesquelles les greffons osseux allogéniques sont cryoconservés jusqu'à utilisation. Ces greffons sont essentiellement issus des têtes fémorales prélevées sur des patients bénéficiant d'une arthroplastie de la hanche. Pour éviter tout risque de rejet des greffons, les os doivent subir des séries de traitements. Dès la fin des années 80 des méthodes de dévitalisation ont été développées, et un solvant organique fort (chloroforme ou acétone) est utilisé pour dégraisser le tissu osseux spongieux contenant des adipocytes, qui représentent jusqu'à 60 % en masse d'une tête fémorale une fois le cartilage éliminé.

3.1.3. Les greffes osseuses xénogéniques.

Les greffons xénogéniques proviennent d'une espèce différente de celle du receveur. Ils sont en très grande majorité d'origine animale, notamment d'origine bovine. Comme l'os allogène, il subit des traitements pour ne garder que la trame minérale et le rendre biocompatible, lui conférant ses propriétés ostéoconductrices. Le traitement des os bovins, essentiellement obtenus des carcasses, nécessite en particulier une décellularisation.

Un tel type de greffon n'a alors que peu d'avantages par rapport à un produit synthétique. Face à ces principales limites, le développement de biomatériaux / substituts innovants peut alors offrir des nouvelles stratégies thérapeutiques.

3.2. Les matériaux pour l'ingénierie du tissu osseux.

De nombreux matériaux de comblement ont été développés pour pallier le manque de tissu osseux disponible pour les greffes. Ces matériaux peuvent être disponibles en grande quantité et sont prêts à l'emploi. Ils doivent être facilement manipulables et répondre aux propriétés mécaniques du site à réparer. Ces matériaux cherchent à mimer le tissu osseux en s'inspirant de la phase organique de l'os (30 à 40 % du poids sec) et/ou de la phase minérale sous forme de phosphate de calcium apatitique (60 à 70 % du poids sec).

	Materials	Advantages	Disadvantages
Natural polymers	Collagen	Osteocompatible, easily embedded into the tissue matrix	Low mechanical strength, adverse immunological response
	Gelatin	Versatile and relatively low cost, porous structure of gelatin scaffolds can be easily tailored	Poor mechanical properties
	Chitosan	Biodegradation rate can be tailored by the amount of residual acetyl content, chemical modifications of chitosan adjust physical properties, antimicrobial activity	Poor mechanical properties
	Hyaluronic acid	Easy chemical modification, non-antigenic, injectable	Rapid degradation
	Agarose	Osteoconductive, hemostatic, injectable	Poor mechanical properties
	Alginate	Wide range of gelling, biocompatibility, easy chemical modifications	Purification needed to remove possible mitogenic, cytotoxic and apoptosis-inducing impurities
Synthetic polymers	Polylactic acid (PLA)	Good processability, cost-effective	Hydrophobic, slow degradation
	Poly-Ɛ-caprolactone (PCL)	Very good processability, inexpensive, easily blended with other polymers	Slow degradation
	Polyurethane (PU)	Excellent mechanical properties	Precursors have to be accurately chosen to obtain PU with low-toxicity degradation products
Bioceramics	Bioactive glasses	Bioactive, improve cell differentiation	Brittle
	Hydroxyapatite (HA)	Bioactive, non-inflammatory	Slow degradation, brittle
	Tricalcium phosphate (TCP)	Osteoconductive, support of osteogenic differentiation in vivo	Slow degradation, Brittle
Metals	Magnesium alloys	Osteogenesis enhancement, immunomodulation, angiogenesis	Corrosion by-products (H_2 production, alkalinization)

Tableau 1 : Principaux matériaux utilisés pour la réparation osseuse (Mochi *et al*. 2022).

Les premiers biomatériaux ont été utilisés dans les années 1950, et sont décrits comme des biomatériaux de première génération. Ils ont été sélectionnés en priorité pour leurs propriétés physiques. Ces derniers avaient pour unique vocation de remplacer les tissus endommagés. Ils devaient donc être bioinertes, et devaient susciter le moins de réactions possibles de l'hôte.

Puis, les biomatériaux de deuxième génération visaient à créer une réponse contrôlée des tissus dans lesquels ils avaient été implantés (résorbabilité, délivrance de médicaments…).

Enfin, l'ingénierie tissulaire s'est développée. Cette stratégie a été décrite pour la première fois par Fung en 1985. L'ingénierie tissulaire a ensuite été définie par Nerem et Sambanis (Nerem & Sambanis 1995) comme « *L'ensemble des techniques et des méthodes s'inspirant des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie, utilisées pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir*

ou améliorer les fonctions des tissus ». Son objectif est de restaurer la fonction des tissus endommagés, offrant une alternative thérapeutique aux greffes osseuses.

Ces produits d'ingénierie tissulaire ont donc pour but d'imiter les propriétés physiques et biochimiques du tissu sain et de fournir un environnement tridimensionnel (3D) favorable à l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire, et rétablir ainsi la fonction physiologique d'un tissu.

3.2.1. Cahier des charges d'un biomatériau.

Comme précédemment cité, les biomatériaux développés doivent répondre à un cahier des charges strict (Figure 32), dont le cadre est donné par la norme ISO 10993-6. Dans cette norme, les effets avant et après implantation de biomatériaux doivent être évalués. Les biomatériaux doivent fournir un environnement 3D favorable à la prolifération cellulaire et/ou à la différenciation vers le lignage d'intérêt. Pour cela ils doivent être poreux afin de favoriser la migration cellulaire et la diffusion des molécules et des nutriments nécessaires à la survie cellulaire. Les biomatériaux doivent être biocompatibles, c'est-à-dire ne pas induire de réponses inflammatoires ou allergiques induisant le rejet, voire la nécrose du matériau et du tissu environnant. Par ailleurs, le matériau doit pouvoir s'intégrer parfaitement dans les tissus environnants pour offrir une bonne interface. Ils doivent être à la fois biodégradables pour laisser place au tissu de remplacement, tout en étant résistants aux contraintes mécaniques. De plus, le matériau doit pouvoir être stérilisé avant utilisation par le clinicien, afin d'éviter le risque d'infection.

Pour la réparation osseuse, le matériau peut être en plus ostéoconducteur, c'est-à-dire qu'il sert de support à la réparation osseuse en favorisant l'adhésion des ostéoblastes. Le matériau peut aussi être ostéoinducteur, ce qui signifie qu'il va pouvoir recruter localement des cellules mésenchymateuses indifférenciées et induire leur différenciation en cellules ostéocompétentes.

La biocompatibilité est une propriété essentielle de tout biomatériau, car ce dernier doit interagir avec l'organisme et remplir sa fonction sans provoquer de réponses immunitaires. Williams (Williams 2008) a défini la biocompatibilité comme étant la « *capacité d'un biomatériau à remplir sa fonction souhaitée par rapport à une thérapie médicale, sans provoquer d'effets locaux ou systémiques indésirables chez le receveur ou le bénéficiaire de cette thérapie, mais en générant la réponse cellulaire ou tissulaire bénéfique la plus appropriée dans cette situation spécifique, ainsi que l'optimisation des performances cliniquement pertinentes de cette thérapie* ».

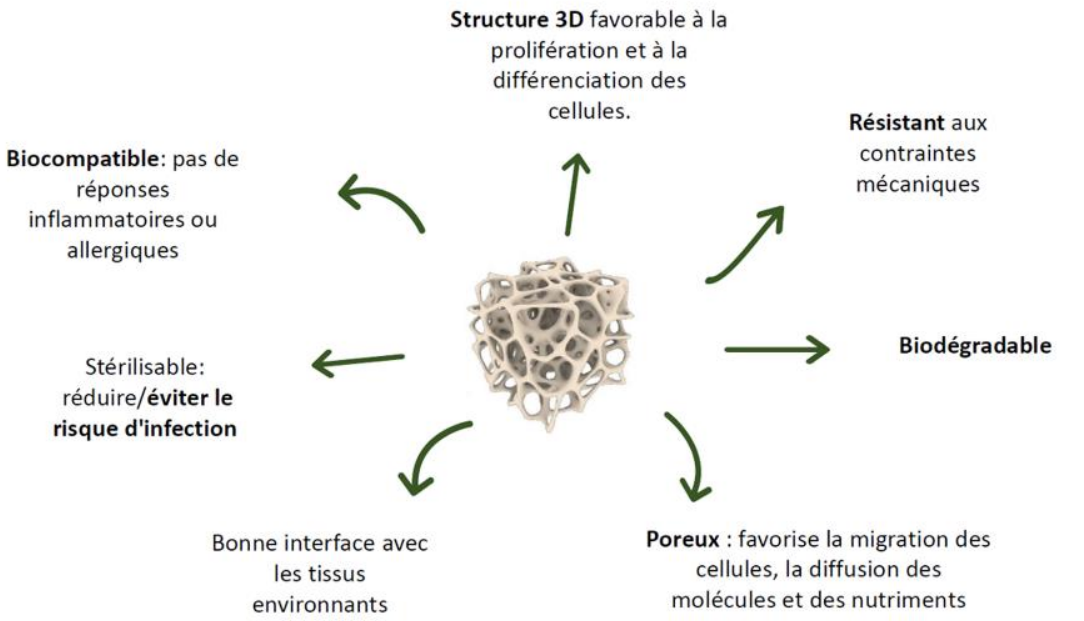


Figure 32 : Cahier des charges d'un biomatériau idéal, adapté de (site Inserm 2017).

Pour développer un biomatériau possédant une structure favorable à la prolifération et la survie cellulaire, deux critères sont essentiels : sa composition chimique et ses caractéristiques morphologiques. Une architecture favorable, en particulier la topographie du matériau, contrôle les mécanismes liés à la réparation osseuse (Belaud *et al*. 2018). En effet, les cellules sont mécanosensibles, c'est-à-dire que leur comportement va s'adapter à la surface à laquelle elles sont confrontées. Bigerelle et ses collaborateurs (Bigerelle *et al*. 2011) ont montré que les MSCs répondent différemment selon la rugosité de la surface des matériaux, étant essentiellement sensibles aux rugosités nanométriques.

La porosité, qui influe sur les propriétés mécaniques du matériau, joue aussi un rôle majeur dans l'invasion cellulaire. Les pores doivent être interconnectés, avec des dimensions adaptées pour favoriser la pénétration cellulaire et la circulation de l'oxygène et des nutriments présents dans les fluides biologiques. L'environnement doit être interconnecté (Li *et al*. 2001; Tibbitt & Anseth 2009) pour permettre ces échanges de molécules et des facteurs de signalisation dans l'intégralité du matériau. La taille minimale des pores décrite dans la littérature pour satisfaire l'ostéogenèse est comprise entre 75 et 100 µm (Marrella *et al*. 2018; Razavi *et al*. 2019), alors qu'un diamètre de pore trop important peut ne pas favoriser l'adhérence cellulaire.

3.2.2. Les matériaux utilisés en réparation osseuse.

Quelques matériaux utilisés pour la réparation osseuse sont décrits dans les parties suivantes. Bien qu'ils soient présentés de manière individuelle, les stratégies actuelles visent à les combiner afin de bénéficier des avantages de chacun.

3.2.2.1. Les céramiques : exemple des apatites carbonatées.

La partie minérale de l'os peut être mimée par les céramiques phosphocalciques (CaP), qui sont proches de la composition de la phase inorganique de l'os. L'hydroxyapatite, le phosphate de calcium tricalcique (β-TCP), et des mélanges d'hydroxyapatite / β-TCP en proportions variables sont les plus couramment utilisés en chirurgie orthopédique. Ces phosphates de calcium se présentent sous forme de blocs ou de granules. Ils sont fabriqués à partir d'une poudre mise en forme à froid puis chauffée en dessous du point de fusion, entraînant une consolidation de la structure.

Il a été montré que les CaP permettent l'adhérence des ostéoblastes, leur prolifération ainsi que leur différenciation. Une fois différenciées ces cellules produisent leur propre MEC composée essentiellement de collagène de type I.

Éléments (% m.)	Email	Dentine	Os compact	HA	β-TCP
(Ca/P)	1,620	1,590	1,610	1,667	1,5
Calcium	36,1	35,0	35,5	39,89	38,76
Phosphore	17,3	17,1	17,1	18,499	19,97
Dioxyde de carbone	3,0	4,0	4,4	-	-
Magnésium	0,5	1,2	0,9	-	-
Sodium	0,2	0,2	1,1	-	-
Potassium	0,3	0,07	0,1	-	-
Chlore	0,3	0,03	0,1	-	-
Fluor	0,016	0,017	0,015	-	-
Soufre	0,1	0,2	0,6	-	-
Zinc	0,016	0,018	-	-	-
Silicium	0,03	-	0,04	-	-

Tableau 2 : Composition chimique des constituants minéraux présents dans les tissus calcifiés, le HA et le β-TCP (Montel *et al*. 1980).

Les données sont présentées en pourcentage massique et le rapport atomique Ca/P permet la caractérisation des phosphates de calcium.

Deux grandes voies de synthèse permettent d'obtenir l'HA et le β-TCP. La première est la voie dite « humide » à basse température (précipitation, traitement hydrothermique et hydrolyse d'autres phosphates de calcium), et la seconde, appelée voie solide ou voie « sèche », se fait à haute température (Aoki *et al*. 1976). La méthode de synthèse la plus répandue est la voie humide car elle permet d'obtenir une poudre plus fine et plus réactive, à un coût énergique plus faible. L'HA et le β-TCP peuvent être synthétisés à partir des mêmes composés de départ. En faisant varier les paramètres de synthèse comme le pH, la température et le rapport atomique Ca/P, on peut déterminer la composition finale du produit de réaction (Bouler *et al*. 2000).

D'autres céramiques peuvent être utilisées, comme les bioverres qui sont des matériaux à base de silice, de phosphore et de calcium. Ces matériaux ont l'avantage d'être biocompatibles et d'induire une cascade de réactions biologiques similaires à celle de la formation de l'os (LeGeros 2008).

3.2.2.1.1. L'hydroxyapatite (HA).

L'apatite est une famille de minéraux dont la formule de base est $Ca_{10}(PO_4)_6(X)_2$ où X est majoritairement soit un groupe hydroxyl (OH), soit un fluor (F) ou un chlorure (Cl). L'hydroxyapatite est, sur le plan chimique, le phosphate de calcium qui se rapproche le plus de la phase minérale de l'os (Tableau 2). Les hydroxyapatites stœchiométriques de formule $Ca_1(PO_4)_6OH_2$ sont composées à 39,9 % de Ca, 18,5 % de P et 3,38 % d'OH. Son rapport Ca/P est donc de 1,67.

La plupart des ions présents dans le plasma tels que le carbonate, le magnésium, le sodium et des éléments tels que fer et le chlore vont pouvoir se retrouver dans la structure des hydroxyapatites naturelles. Ces substitutions peuvent avoir des répercussions sur la solubilité du composé sans pour autant en modifier la structure (Hughes 1996). Il a été montré que plus le taux d'ions carbonates est élevé, plus l'hydroxyapatite est soluble (Hankermeyer *et al*. 2002). Ces espèces non apatitiques peuvent toutefois modifier la formation d'HA ainsi que ses propriétés physico-chimiques (Lakhkar *et al*. 2013). Elles auraient un rôle dans le stockage des ions en vue de leur libération contrôlée lors du remodelage osseux par exemple.

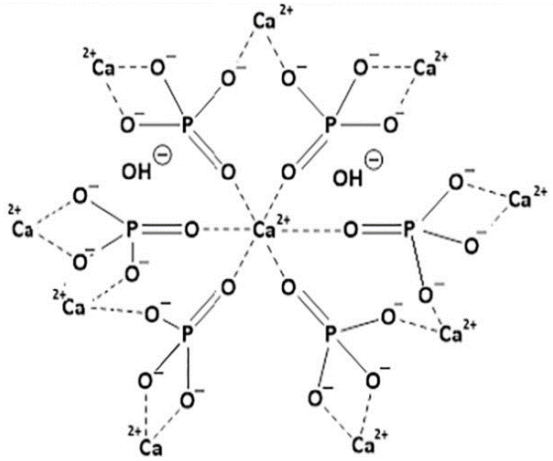


Figure 33 : Structure de l'hydroxyapatite (Pai *et al*. 2021).

Le procédé choisi pour la synthèse de l'apatite est primordial. Selon le procédé choisi, la morphologie, la taille, la cristallinité de l'hydroxyapatite seront différentes. L'HA se résorbe lentement lorsqu'elle est sous forme dense, jusqu'à 3 ans, alors que sous forme de particules elle est plus facilement résorbable du fait de sa solubilité (Fernandez de Grado *et al*. 2018).

3.2.2.1.2. Le phosphate de calcium tricalcique (TCP).

Le TCP existe sous différentes formes cristallines. La synthèse à moins de 700°C donne le phosphate tricalcique amorphe (A-TCP). De 700°C à environ 1125°C il se transforme en β-TCP stable, et au-delà de 1125°C, il se transforme en α-TCP et s'accompagne d'une augmentation de la taille de la maille cristalline. Le coût énergétique de la synthèse des TCP est donc élevé.

Le β-TCP de formule $Ca_3(PO_4)_2$ est la forme la plus utilisée en ingénierie osseuse (Figure 34). Sa composition chimique est proche de celle de l'HA, et son ratio Ca/P est de 1,5. Sa vitesse de résorption est de 13 à 20 semaines ce qui est plus rapide que celle de l'HA (Fernandez de Grado *et al*. 2018).

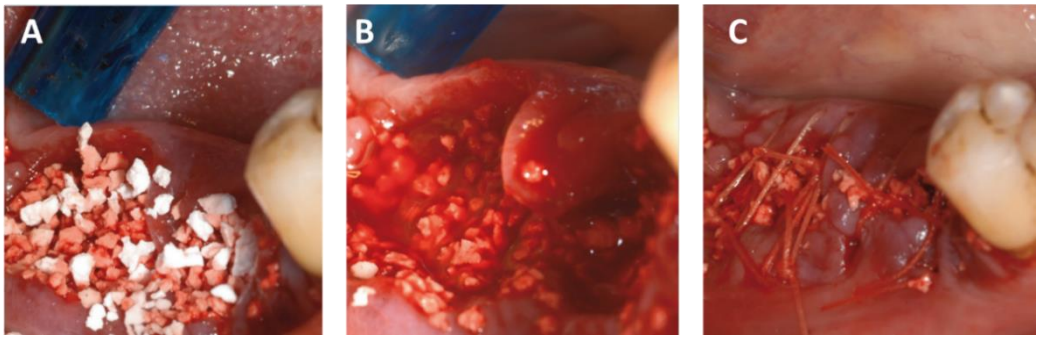


Figure 34 : Implantation de phosphate de calcium tricalcique granulaire en défaut osseux alvéolaire (Seban 2008).

Les formes commercialisées les plus répandues sont sous formes de céramiques frittées, de revêtements réalisés sur des céramiques ou sur du métal, ainsi que sous forme de composites.

Il est possible de moduler la vitesse de dégradation des hydroxyapatites en les mélangeant avec du β-TCP. Plus le rapport β-TCP/ hydroxyapatite est élevé, plus la dissolution est rapide. Un pourcentage de β-TCP supérieur à 25 % dans les céramiques d'hydroxyapatite assure une bonne intégration dans le tissu osseux. D'autres facteurs comme la densité, la taille des grains et la porosité des céramiques peuvent également moduler leur vitesse de résorption.

3.2.2.2. Les métaux.

Les métaux sont les premiers biomatériaux à avoir été utilisés. Ils sont surtout employés pour assurer le maintien des structures osseuses, car ils ont la capacité de supporter des contraintes élevées (Martz 1956). Ils sont majoritairement utilisés dans le cas du traitement des prothèses de hanche et du genou, mais on les retrouve aussi sous forme de plaques et de vis pour aider à la stabilisation des fractures.

Les implants médicaux métalliques sont en réalité des alliages, ce qui signifie qu'ils combinent différents constituants dont au moins un est un métal. Les métaux les plus retrouvés dans les dispositifs médicaux sont le fer (Fe), le chrome (Cr), le cobalt (Co), le nickel (Ni), le titane (Ti), le tantale (Ta), le niobium (Nb), le molybdène (Mo), et le tungstène (W). L'inconvénient majeur est qu'ils peuvent être tolérés par le corps qu'en petites quantités, car les ions métalliques sont libérés par dissolution (Arvidson & Wróblewski 1978). Les ions métalliques dissous forment alors des complexes métallo-protéiques empêchant le transport des éléments nutritifs, ce qui peut entraîner une lyse des cellules adjacentes et une dégradation de la matrice extracellulaire. Le processus peut alors aboutir au descellement de l'implant.

Ces problèmes de corrosion ont conduit au développement des biomatériaux métalliques de seconde et de troisième génération. Le plus utilisé est l'acier inoxydable. Ce dernier est composé de fer à plus de 50 %, d'une faible proportion de carbone (au maximum 1,2 %), ainsi que de chrome (17-18 %) et de nickel (9-12 %). Le titane et ses alliages sont utilisés principalement en chirurgie orthopédique et dentaire.

3.2.2.3. Les polymères synthétiques.

Un polymère est un matériau formé par un ensemble de macromolécules de même nature chimique. Il est issu de l'enchaînement covalent d'un grand nombre de motifs ou unités monomériques pouvant être identiques ou différents. Les biomatériaux polymériques sont des polymères organiques contenant dans leurs chaînes des carbones et des hydrogènes. L'enchaînement des unités répétitives peut se faire de façon linéaire (polymères linéaires), ou présenter des ramifications aléatoires (polymères branchés) ou systématiques et régulières (dendrimères). Les principaux polymères utilisés en réparation osseuse sont l'acide polylactique (PLA), le polycaprolactone (PCL), le polyurethane (PU) ou encore le polyéthylène glycol (PEG) (Figure 35).

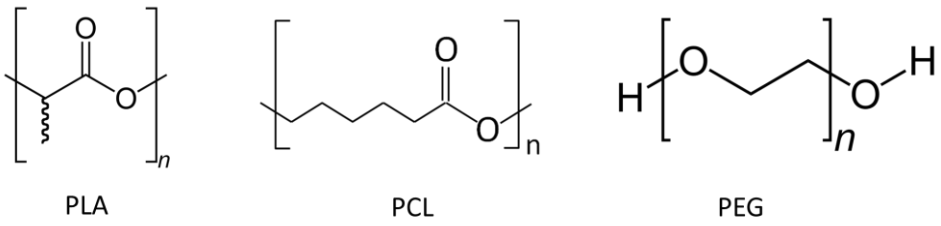


Figure 35 : Structure chimique des principaux polymères utilisés dans les matériaux de réparation osseuse.

Ils ont été très étudiés durant les soixante dernières années du fait de leur faible coût de production, de la reproductibilité des procédés de fabrication et de leurs propriétés (légèreté, résistance à la dégradation cellulaire et vieillissement chimique). Leur inconvénient majeur est qu'ils sont obtenus par des procédures de chimie lourde dérivant des ressources pétrochimiques. Du fait des enjeux environnementaux, l'étude des polymères d'origine naturelle ou biosourcés est actuellement en plein essor.

3.2.2.4. Les polymères naturels.

Les polymères d'origine naturelle les plus utilisés pour la réparation osseuse sont d'origine polysaccharidique et polypeptidique.

Parmi les polymères polysaccharidiques, la cellulose, la chitine, l'acide hyaluronique, le pullulane et le dextrane sont les plus utilisés. Ce sont des polymères formés par la condensation d'unités de sucres, aussi appelés monosaccharides. Ils ont l'avantage d'être disponibles en grandes quantités et à faible

coût, et de posséder une grande variété de propriétés et de structures. Actuellement, les stratégies visent à obtenir les polysaccharides de manière biosourcée. Prenons l'exemple de la chitine, qui est le principal constituant des carapaces de crustacés et que l'on retrouve en grande quantité dans les déchets : par désacétylation il est possible d'obtenir du chitosan (Aranaz *et al*. 2009), qui reste très utilisé en ingénierie tissulaire pour de nombreuses applications.

Les polymères polypeptidiques sont des polymères d'amino-acides souvent de haut poids moléculaire. Les plus utilisés sont des protéines humaines comme le collagène et son homologue la gélatine (Cen *et al*. 2008). Le collagène est la protéine la plus abondante dans la MEC des tissus osseux. C'est une protéine extrêmement structurée sous forme de fibres de collagène, ce qui la rend difficilement manipulable. Il est alors préférable d'utiliser la gélatine qui est obtenue par dénaturation du collagène, et qui peut entraîner une réponse immunitaire moins importante que celle observée avec le collagène (Lynn *et al*. 2004). La gélatine utilisée pour former des matériaux est essentiellement d'origine marine ou bovine (Singh & Dasgupta 2022).

3.2.2.5. Les matériaux composites et multi échelle.

La bioactivité des matériaux peut être améliorée par plusieurs méthodes dont des modifications physiques et/ou chimiques. Ces stratégies incluent la modification de la topographie de surface au niveau micro et nanométrique, des changements de surface, ainsi que des revêtements chimiques. Les modifications inorganiques sont principalement basées sur des revêtements de phosphate de calcium biomimétique, tandis que les modifications organiques font référence à la fonctionnalisation de matériaux par des (bio)-polymères, des peptides et des protéines. Cette partie sera discutée paragraphe IV. Quoi qu'il en soit, les stratégies actuellement développées se focalisent principalement sur des biomatériaux composites, associant métaux et/ou céramiques à des polymères.

Dans la partie suivante sera discutée la mise en forme de ces matériaux composites de type hydrogels, lorsqu'ils sont associés à des particules de phosphate de calcium.

3.2.2.5.1. Les hydrogels.

Les hydrogels sont des gels aqueux utilisés en tant que dispositifs médicaux depuis les années 1960, comme par exemple les lentilles oculaires (Sandt 1960). Ils peuvent être composés de différents polymères, associés par réticulation. Ces polymères hydrophiles vont absorber et maintenir de très grandes quantités d'eau, ou de fluide biologique, sans se dissoudre et sans perdre leur structure. Les polymères vont former un réseau caractérisé par des nœuds. Deux phases distinctes apparaissent alors : une phase liquide et une phase solide gélifiée. Les connexions qui permettent la formation des hydrogels peuvent être soit irréversibles dans le cas de liaisons covalentes, soit réversibles quand elles sont stabilisées par des liaisons faibles de type hydrogène (Figure 36). Ces hydrogels ont l'avantage

d'avoir une structure similaire à celle de la MEC (Park & Song 2005), ce qui en font des candidats potentiels pour des applications en ingénierie tissulaire.

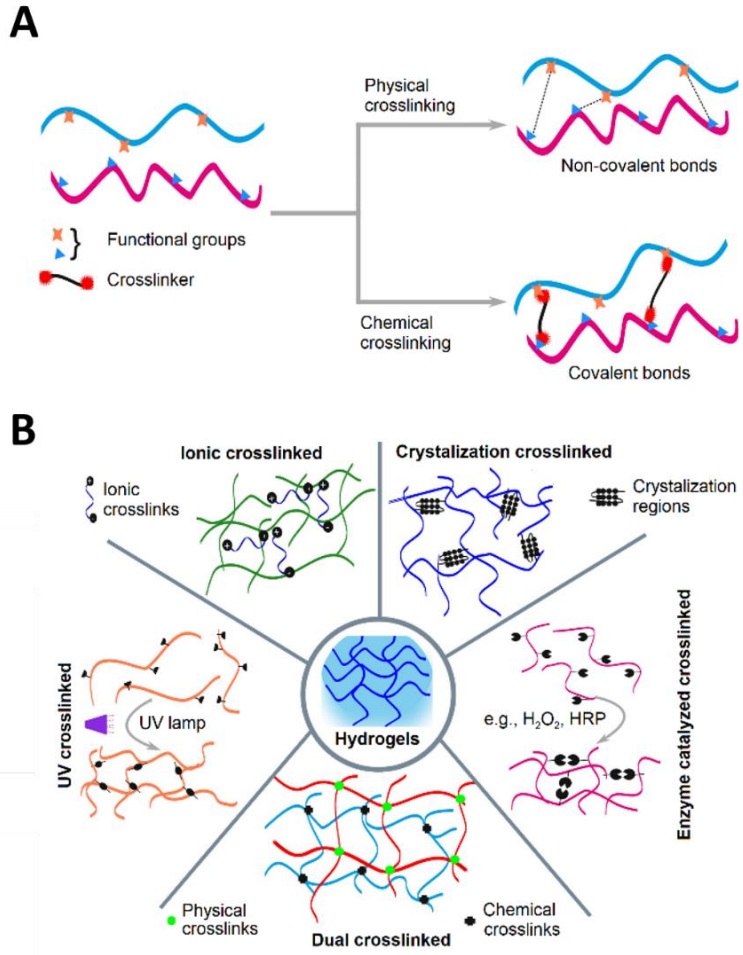


Figure 36 : Schéma représentant les réticulations physiques et chimiques, le type de liaisons créées (A), ainsi que les principales techniques de réticulation utilisées (B) (Bhattacharjee and Ahearne, 2021).

3.2.2.5.1.1. Les hydrogels physiques.

Le processus de formation des hydrogels physiques est réversible. Ces hydrogels sont formés par des interactions faibles de type liaison hydrogène, interaction hydrophobe ou de Van der Waals. Ils sont donc dépendants de facteurs physiques comme la température, la force ionique, le champ magnétique ou le pH, ce qui leur a valu d'être nommé « *Smart hydrogels* » (Mantha *et al*. 2019). Il est possible de faire varier ces facteurs externes, pour continuellement créer et casser les liaisons. Les hydrogels sensibles à la température ont été les plus étudiés pour des applications *in vivo*, le but étant qu'ils se forment à la température corporelle après injection, ou qu'ils libèrent des principes actifs qui leur sont associés (Koland *et al*. 2022).

3.2.2.5.1.2. Les hydrogels chimiques.

Les hydrogels chimiques sont obtenus de manière irréversible par la formation de liaisons covalentes. Ceci signifie qu'une fois le gel formé, il est impossible de retourner à l'état initial, et que si les points de réticulations sont détruits, ils sont non régénérables. Ces hydrogels sont formés par réticulation grâce à des catalyseurs. La réticulation est la réaction chimique qui consiste à former des réseaux de polymères en 3 dimensions à partir de monomères. Ces hydrogels chimiques sont en général beaucoup plus résistants du fait de leur insolubilité dans les solvants, contrairement aux hydrogels physiques. Toutefois des défauts dans la structure du réseau peuvent apparaitre du fait des extrémités des chaînes libres non réticulées, des enchevêtrements et des boucles de chaînes macromoléculaires qui ne contribuent pas à l'élasticité du réseau (Figure 37). Ils sont donc plus sensibles à la déformation et au gonflement que les hydrogels physiques.

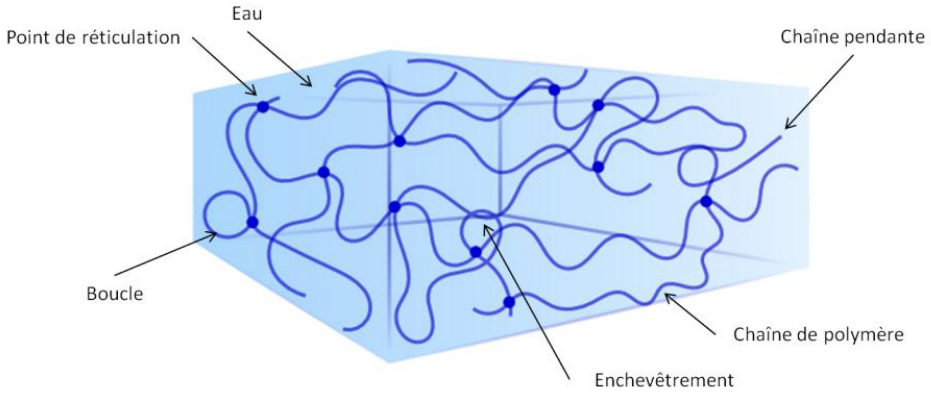


Figure 37 : Représentation schématique d'un hydrogel chimique de polymère gonflé dans l'eau, réticulé présentant différents types de défauts structuraux (Macron 2014).

Les chaînes de polymères vont être réticulées au niveau des points de réticulation ou nœuds. Des défauts dans le réseau peuvent apparaître comme les enchevêtrements et les boucles. L'espace entre les polymères est comblé par de l'eau.

3.2.2.5.1.2.1. Principales techniques de réticulation chimique.

Deux techniques principales permettent d'obtenir des hydrogels chimiques par réticulation. La première est la polymérisation en chaîne, la seconde est la polymérisation suivie d'une réticulation. Cette dernière nécessite que les polymères soient préalablement fonctionnalisés.

La polymérisation en chaîne est une synthèse pour laquelle la croissance d'une chaîne polymère résulte exclusivement d'une ou plusieurs réactions entre le monomère et le site réactif de la même chaîne de polymère (Figure 38A). Le ou les sites réactifs sont régénérés à la fin de chaque étape de croissance (Okawa & Aono 2001). Trois étapes successives ont lieu. L'amorçage de la réaction, suivie de la propagation des monomères, puis la terminaison de la réaction. La première étape d'amorçage permet

de créer des sites actifs, qui seront utilisés pour le greffage d'autres monomères pour former les chaînes de polymères pendant l'étape de propagation des monomères. La dernière étape est l'arrêt de la réaction par épuisement des sites actifs. Cette technique permet d'obtenir des liaisons entre les molécules dès l'initiation de la réaction.

La deuxième technique consiste en une polymérisation suivie d'une réticulation des chaînes (Figure 38B). Les polymères qui formeront la structure des hydrogels sont préparés, puis un agent de réticulation est ajouté pour permettre la réticulation de l'hydrogel. Cette méthode est largement utilisée pour obtenir des matériaux à visée médicale, car elle permet d'encapsuler ou d'adsorber des molécules actives ou des cellules dans l'hydrogel. Pour que la réticulation puisse avoir lieu, les extrémités des polymères doivent être compatibles pour permettre à l'agent réticulant de catalyser la réaction et de former des liaisons covalentes inter-chaînes. La réticulation a alors lieu à la toute dernière étape.

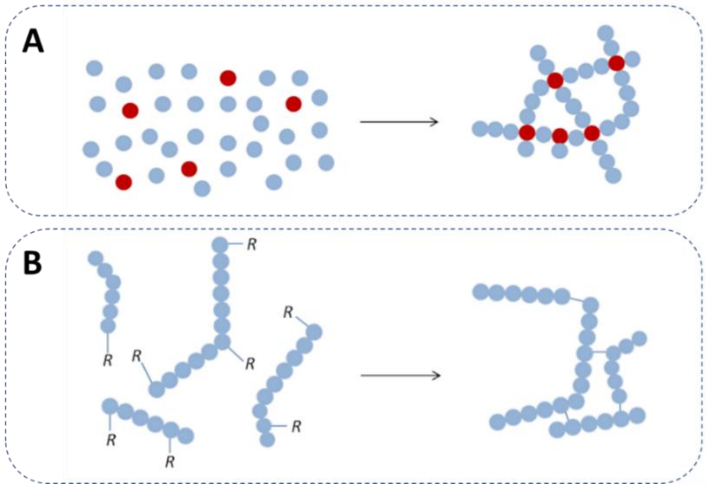


Figure 38 : Synthèse d'hydrogels par polymérisation par réticulation simultanée à partir de monomères (A), et par réticulation de chaînes polymères fonctionnalisés (B) (Macron 2014).

3.2.2.5.1.2.2. Les réticulants utilisés.

Différentes molécules de réticulation comme les peptides dicystéine (Lee *et al*. 2017), le dithiothréitol (DTT) (Peng *et al*. 2016; Shu *et al*. 2002) ou le glutaraldéhyde (Stevens *et al*. 2002) peuvent être utilisés. Les photo-réticulations sont réalisées sous lumière UV ou visible, en présence d'un photo-initiateur (Figure 39). Le photo-initiateur est une espèce sensible aux rayonnements dû à la présence de groupes chromophores, essentiellement des doubles liaisons. Lors de l'absorption d'un photon, le composé va se dissocier en groupements radicalaires, ce qui va conduire à la catalyse de la réticulation. Les photo-initiateurs sont caractérisés par leur capacité à produire des radicaux libres, par un spectre d'absorption spécifique et un coefficient d'extinction molaire associé, par leur solubilité et leur stabilité en milieu aqueux.

Pour des applications en ingénierie tissulaire, le photo-initiateur le plus utilisé est le (1-[4-(2-hydroxyéthoxy)-phényl]-2-hydroxy-2-méthyl-1-propane-1-one), aussi connu sous le nom d'Irgacure 2959. Il se dissocie en radicaux libres lors d'une irradiation à la lumière UV *via* une réaction de clivage pour former des radicaux benzoyle et cétyle (Liu *et al*. 2014, p.).

D'autres photo-initiateurs comme le phényl-2,4,6-triméthylbenzoylphosphinate de lithium (LAP) sont utilisés (Brown *et al*. 2018). La riboflavine (Hu *et al*. 2012) et l'éosine-Y (Shih *et al*. 2017) sont sensibles à la lumière visible. Ils ont été développés pour réduire les effets nocifs de l'irradiation UV sur les cellules qui peuvent être encapsulées dans des matériaux.

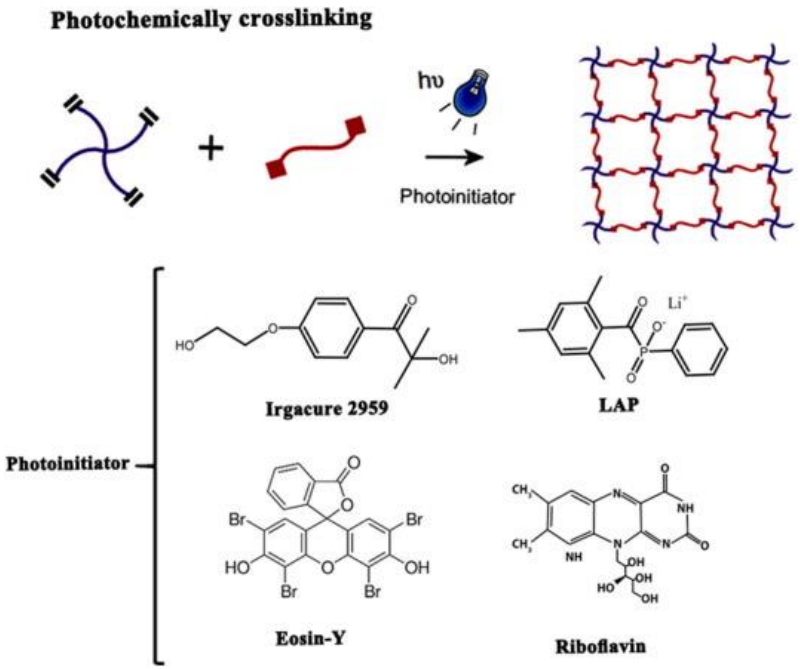


Figure 39 : Méthodes de photo-réticulation pour obtenir des hydrogels chimiques et principaux photo-initiateurs (Nezhad-Mokhtari *et al*. 2019).

Les enzymes sont d'excellents catalyseurs des réactions biochimiques *in vivo* et peuvent donc être utilisés pour la formation d'hydrogels. Parmi les enzymes les plus utilisés, on peut citer la transglutaminase, la tyrosinase, la lysyl oxydase et la peroxydase (Nezhad-Mokhtari *et al*. 2019). La transglutaminase est une acyl-transférase qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre les groupes amine libres présents sur les résidus de lysine et d'arginine, et le groupe amide des résidus de glutamine. De nombreuses études ont utilisé cette enzyme pour catalyser la réaction entre la gélatine et des glycosaminoglycanes (De Colli *et al*. 2012). Les peroxydases sont des enzymes qui catalysent des réactions d'oxydo-réduction, en réduisant par exemple un peroxyde pour oxyder un substrat d'intérêt, comme des tyramines (Amini & Nair 2012). Les méthodes enzymatiques sont toutefois coûteuses et plus difficiles à mettre en place dans un procédé industriel.

3.2.2.5.1.2.3. Rôle de la densité de réticulation.

Le degré de réticulation est un paramètre clé qui influe à la fois sur la formation des hydrogels et sur leurs propriétés finales. Il peut dépendre de la concentration en agent réticulant, de la quantité de groupes fonctionnalisés et du temps de réticulation.

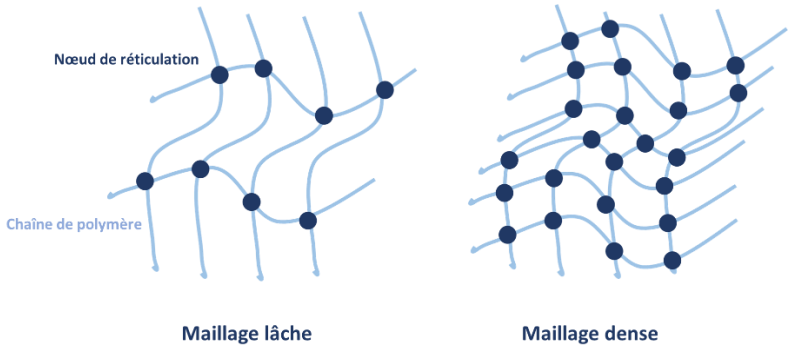


Figure 40 : Représentation du degré de réticulation d'un hydrogel.

Une faible réticulation donnera un maillage lâche avec moins de nœuds de réticulation. Ceci est propre aux hydrogels ayant de faibles propriétés mécaniques, et est propice à la diffusion des macromolécules. *A contrario*, un degré de réticulation plus important va permettre de mieux structurer l'hydrogel, et pourra permettre par exemple l'encapsulation de molécules thérapeutiques pour une délivrance mieux contrôlée.

Chavda et Patel (Chavda & Patel 2011) ont développé des hydrogels à base de polyacrylamides dans lesquels ils ont fait varier la concentration d'agent réticulant, ici le N,N'-Méthylènebisacrylamide (BIS). L'augmentation de la concentration en BIS a eu un effet positif sur la stabilité mécanique, mais des effets négatifs sur le gonflement des hydrogels. En effet, plus la concentration de BIS est élevée, plus la densité de la réticulation est élevée, et plus la porosité est faible, ce qui peut entraîner une diminution de l'efficacité de libération de l'agent thérapeutique. *A contrario*, un matériau plus lâche est plus sensible à la dégradation favorise la libération de molécules.

3.2.3. Mise en forme des matrices composites pour l'obtention de structures poreuses et interconnectées.

Dans les paragraphes précédents, les principaux matériaux utilisés pour des applications en réparation osseuse ont été décrits. Aujourd'hui, ces matériaux sont souvent combinés pour former des matériaux composites. Ils présentent des degrés de complexité plus élevés pour moduler plus finement leurs caractéristiques physico-chimiques. Cette complexification est nécessaire pour mimer au mieux les différentes phases du tissu osseux.

De nombreuses techniques sont utilisées pour induire la formation de structures poreuses et interconnectées telles que l'émulsification (Liu, Rauth, *et al*. 2007), la lixiviation des porogènes (Wu *et al*. 2015), le moussage de gaz (Beşkardeş *et al*. 2015), l'électrofilage (Ji *et al*. 2006) et la photolitographie (Revzin *et al*. 2001). Pour des applications en ingénierie tissulaire, ces techniques sont

aujourd'hui moins utilisées au profit des techniques comme l'impression 3D, la lyophilisation de cryogels, et le « *freeze casting* », qui seront discutés dans les parties suivantes.

3.2.3.1. L'impression 3D.

L'impression 3D ou fabrication additive a vu son développement exploser ces dix dernières années. Cette technique permet une grande reproductibilité et un contrôle précis de la porosité et de l'interconnectivité des matériaux obtenus. Elle peut également s'adapter à des défauts précis de différentes tailles et de différentes formes, ce qui permet la création de substituts pour une médecine personnalisée.

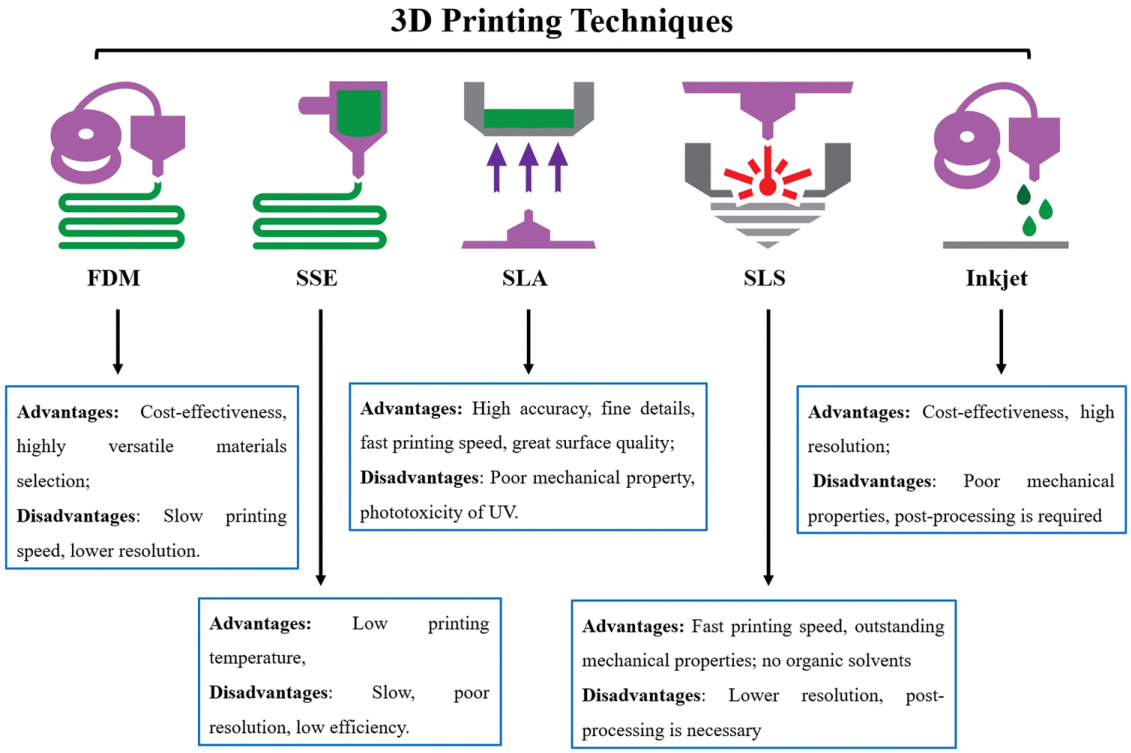


Figure 41 : Principales techniques d'impression ainsi que leurs avantages et inconvénients (Zhang *et al*. 2022).

Pour ce faire, le défaut du patient concerné doit être scanné afin de connaître les dimensions souhaitées. Le matériau va ensuite être modélisé sur ordinateur avec l'application des paramètres mesurés. Grâce à un logiciel, l'objet va être traité afin de le découper en différentes couches nécessaires à sa fabrication. Enfin, une cohésion entre les couches doit être maintenue pour garantir l'intégrité du matériau final.

Différentes techniques d'impression existent. Leur utilisation diffère selon la mise en forme de la matière souhaitée et la nature des matériaux utilisés. Parmi les techniques les plus répandues on note l'impression par jet de liant (*binder jetting*), le frittage sélectif par laser (SLS), le dépôt de fil fondu (FDM), la stéréolithographie (SLA), la micro extrusion (*3D plotting*) et l'*electrospinning* (Figure 41). En

ce qui concerne la bioimpression, c'est-à-dire l'impression de cellules, la micro extrusion (SSE) et l'impression assistée par laser sont plébiscitées. Ces techniques nécessitent l'obtention d'une bio-encre dans laquelle les cellules sont disséminées. Des hydrogels composites peuvent être obtenus par l'impression de polymères naturels ou synthétiques associés à des céramiques. Pour des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse, la technique par FDM est la plus utilisée (Babilotte *et al*. 2019).

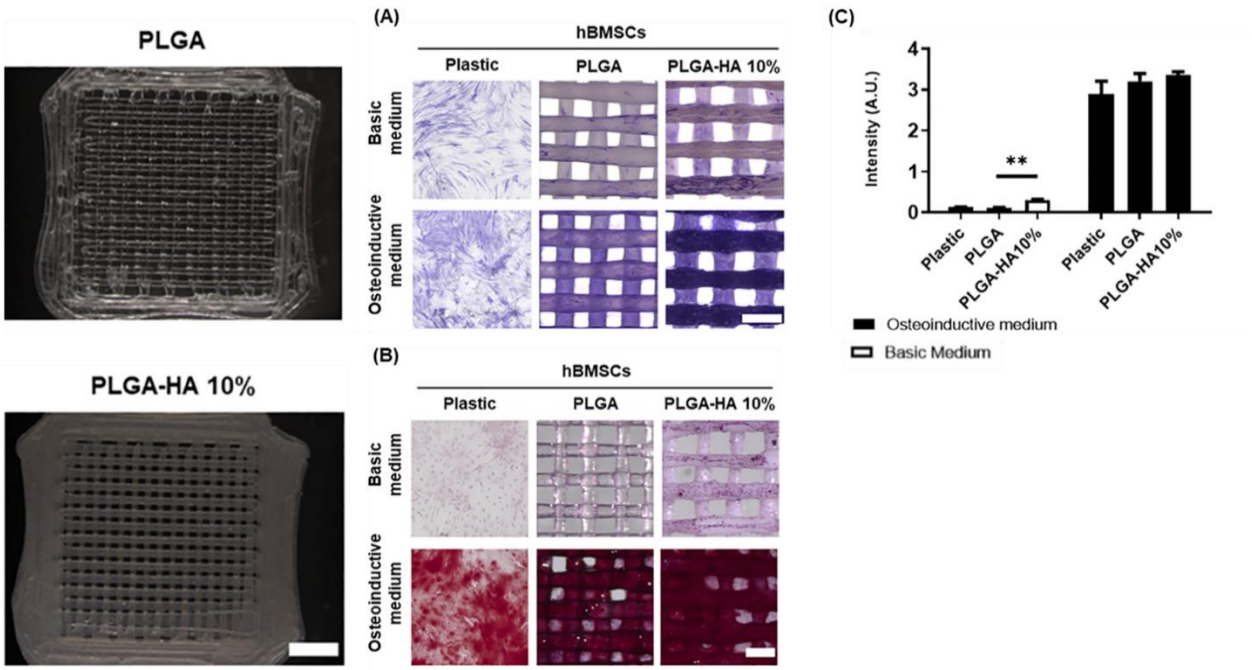


Figure 42 : Impression d'un matériau composite à base de PLGA/HA et évaluation du potentiel d'ostéo-différenciation (Babilotte 2021).

Des cellules humaines MSCs ont été ensemencées sur des matériaux bioimprimés en PLGA et PLGA-HA à 10%. Un puits en plastique a été utilisé comme témoin. (**A**) L'activité de l'ALP a été évaluée par coloration des cellules après 14 jours de culture, avec ou sans milieu ostéoinducteur (barre d'échelle = 500 µm, n = 3). (**B**) Après 21 jours de culture cellulaire, avec ou sans milieu ostéoinducteur, la minéralisation a été évaluée par coloration au Rouge Alizarine (Barre d'échelle = 500 µm). (**C**) La coloration issue du Rouge Alizarine a été extraite des matériaux, et le surnageant a été récupéré pour des mesures d'absorbance à 570 nm afin de quantifier la minéralisation.

Des études au laboratoire BioTis ont permis la bioimpression d'un échafaudage contenant du PLGA et de l'HA par FDM (Babilotte *et al*. 2021). La Figure 42 montre des échafaudages imprimés contenant ou pas 10 % (m/v) d'HA. Une meilleure résolution a été obtenue pour le matériau contenant de l'HA. Une étude *in vitro* a permis d'analyser le potentiel de stimulation de la différentiation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses (MSCs). La culture a été maintenue jusqu'à 21 jours dans un milieu de base et dans un milieu ostéo-différenciateur. L'activité de l'ALP a été évaluée par coloration des cellules (Figure 42A). La minéralisation a été évaluée par coloration au Rouge Alizarine (Figure 42B). Une activité plus intense de l'ALP a été observée dans le cas du matériau contenant l'HA ainsi qu'une minéralisation plus importante (Figure 42C).

3.2.3.2. « Freeze casting » et cryogels.

3.2.3.2.1. Principe.

Le « *freeze casting* », connu également sous le nom de « *ice-templating* », est une méthode permettant de former des pores en solution en utilisant la cristallisation du solvant. En effet, il est possible de permettre la structuration des matériaux par le contrôle de la croissance des cristaux. Le terme *« freeze casting »* est essentiellement utilisé pour la mise en forme de céramiques poreuses, alors que le terme *cryogel* est plus employé pour la formation d'hydrogels poreux. Comparativement à l'impression 3D qui nécessite du matériel particulier comme une imprimante 3D, *le freeze casting* ne nécessite pas de matériel supplémentaire, si ce n'est le solvant d'intérêt.

Brièvement, une solution contenant les réactifs est congelée (Figure 43A). Une diminution de la température est appliquée jusqu'à dépasser le seuil de cristallisation du solvant. Le solvant va alors cristalliser et induire une ségrégation de phase où les solutés vont se retrouver concentrés entre ces cristaux. Après réticulation, les polymères formeront ainsi les futures parois de la matrice. Après sublimation de la glace, une matrice poreuse est obtenue avec des pores ayant la même morphologie que celle des cristaux. Il est ainsi possible de maîtriser la morphologie des pores en contrôlant la nucléation et la croissance des cristaux du solvant. L'une des techniques pour maîtriser la formation des cristaux est de moduler la température, et en particulier de créer un gradient de température. Le temps de cryogélation influe également sur la structure tridimensionnelle des hydrogels (Figure 43B). Le volume du matériau s'en trouve diminué alors que la porosité et la taille moyenne des pores sont augmentées (Shiekh *et al*. 2021).

Les solvants les plus utilisés pour générer des biomatériaux poreux sont le camphre (Kim *et al*. 2019), le méthylpropanol et l'eau. Le camphre a une température de cristallisation (T_{fus}) de 180°C, et ses cristaux forment des pores ayant une morphologie dendritique. Le méthylpropanol a une T_{fus} de 25°C et forme des cristaux prismatiques. L'eau a une T_{fus} de 0°C et ses cristaux ont une morphologie lamellaire. Elle est Le solvant le plus adapté pour la formation de biomatériaux, car elle est abondante, peu onéreuse et non-toxique, contrairement à certains solvant organiques.

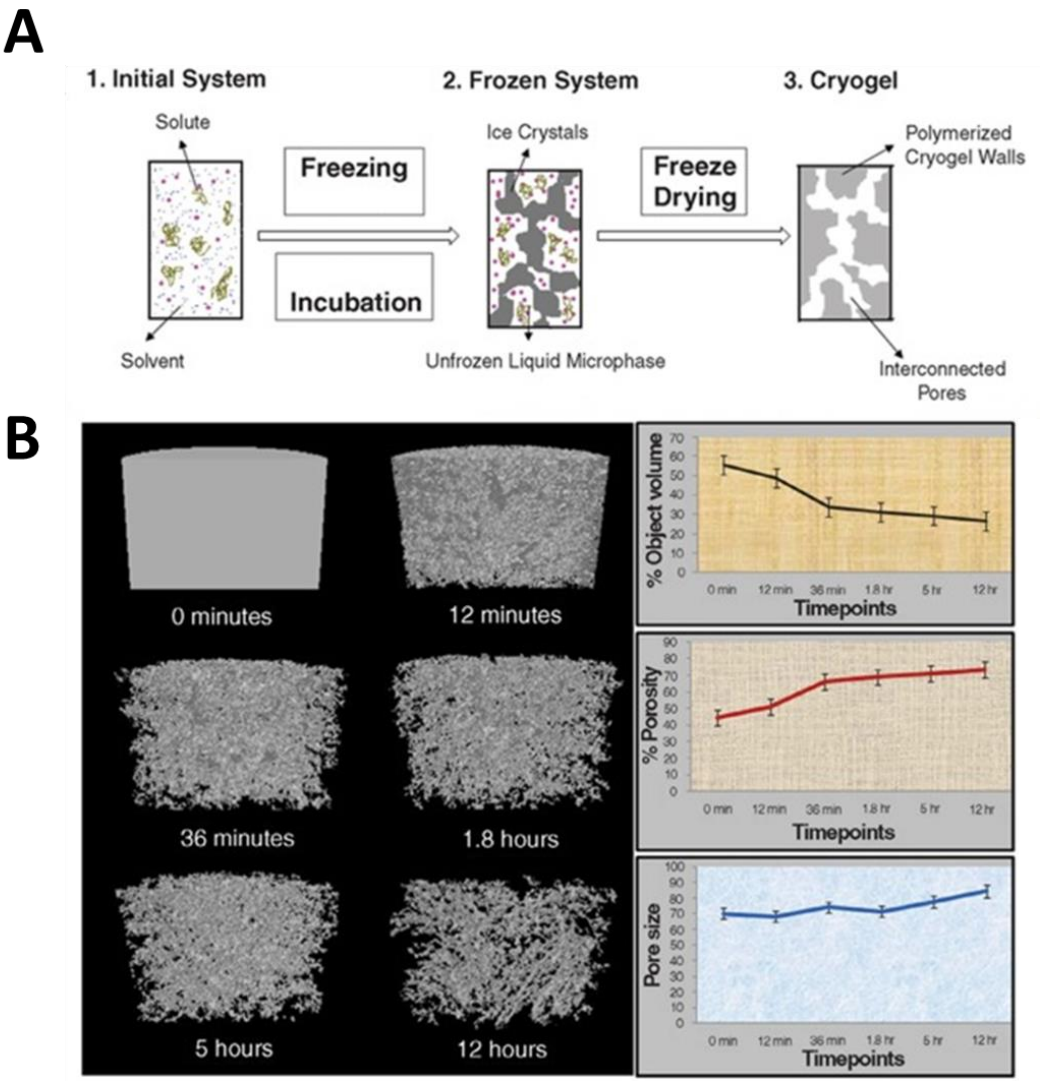


Figure 43 : Synthèse et formation de cryogel (adapté de Shiekh *et al.*, 2021)

(**A**) Schéma représentant les étapes de cryogélation. (**B**) Le temps de cryogélation influe sur la structure tridimensionnelle des hydrogels. Quantification du volume d'objet, de la porosité et de la taille moyenne des pores sur des coupes analysées par micro-CT.

3.2.3.2.2. Effet de la lyophilisation sur la structure des biomatériaux.

La lyophilisation est une technique courante pour déshydrater les produits biologiques et chimiques. Cette déshydratation va permettre d'améliorer la conservation des produits en limitant leur hydrolyse. Dans cette technique de sublimation, l'eau congelée va passer à l'état gazeux. Ceci est possible grâce à une température suffisamment basse (classiquement -80°C) et une pression diminuée. Deux phases successives dites de dessication vont avoir lieu. La première permet d'éliminer l'eau libre, qui représente jusqu'à 90% de la quantité d'eau présente dans l'échantillon, et la seconde élimine l'eau liée au produit par adsorption. La sublimation permet ainsi au solvant de s'évaporer, ce qui va laisser place à des espaces vides, à l'origine de la porosité des matériaux.

Pour moduler la taille des pores il est possible d'utiliser différents solvants (*cf.* paragraphe précédent), de jouer sur la température de la congélation (Bahrami *et al*. 2017), ainsi que sur la pression utilisée.

Une congélation rapide (*snap freezing,* dans de l'azote liquide par exemple) favorise la formation de petits cristaux de glace, ce qui permet de maintenir la structure du matériau. En revanche, une congélation lente à température plus élevée (≈ -20°C) favorise la croissance de plus gros cristaux (30 à 40 µm).

La pression seule peut également influencer la taille des pores. Autissier et ses collaborateurs (Autissier *et al*. 2010) ont développé des matériaux à base de polysaccharides (Figure 44) et ont évalué l'influence de la lyophilisation à 0,1 et 6,5 mbar sur la porosité. Ils ont montré que la pression de lyophilisation module le degré de porosité des matériaux. Les matériaux soumis à une haute pression présentaient des pores d'un diamètre moyen de 55 ± 4 µm et une porosité de 33 ± 12 %, tandis que les matériaux soumis à une basse pression possédaient des pores 5 fois plus grands avec un diamètre moyen de 243 ± 14 µm, ainsi qu'une porosité plus élevée de 68 ± 3 %. Ceci montre que plus la pression appliquée est faible, plus le matériau sera poreux avec un diamètre des pores plus important.

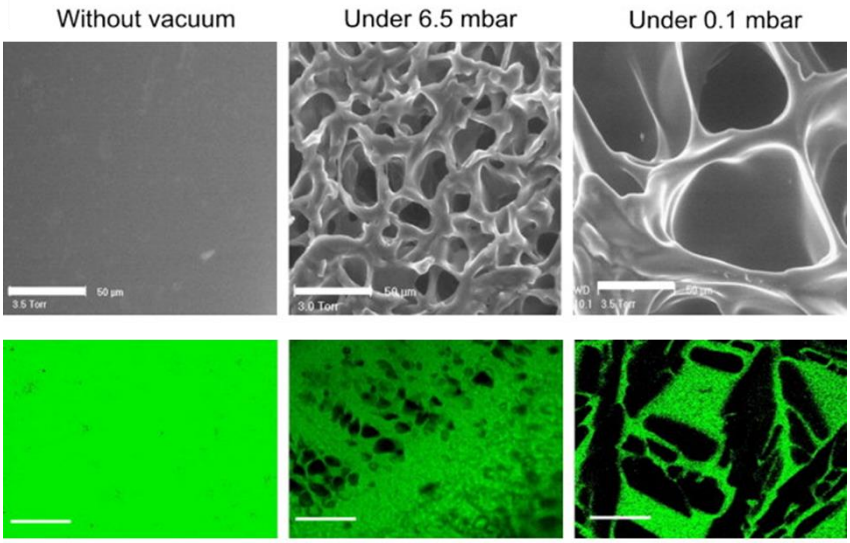


Figure 44 : Structure des hydrogels par microscopie électronique environnementale (Haut) et porosité en microscopie confocale (Bas), en fonction des conditions de lyophilisation (Autissier *et al*. 2010).

Des hydrogels non poreux contenant du pullulane et du dextrane ont été préparés. Ils ont ensuite été soumis à différentes pressions de lyophilisation : sous vide, sous 6,5 mbar et sous 0,1 mbar. Les structures microscopiques (Haut) sont présentées avec une barre d'échelle = 50 µm. Les hydrogels observés par microscopie confocale (Bas) contenaient dans leur structure 1% de FITC avec une barre d'échelle = 200 µm.

3.2.3.2.2. Modulation de la forme et de l'orientation des pores.

Il est possible de réaliser des congélations directionnelles pour permettre la formation de structures ayant une organisation plus définie. Ces approches ont majoritairement été dévolues à la structuration de matériaux de type céramiques, mais des applications pour des matériaux polymériques sont également envisageables (Al-Jawoosh *et al.*, 2018; Algharaibeh *et al.*, 2022).

Différentes techniques de congélation sont présentées dans la Figure 45. Classiquement la congélation est unidirectionnelle et aléatoire car une température unique est appliquée. Si deux gradients de température sont appliqués à l'aide de moules conducteurs, par exemple en téflon, la congélation peut devenir bidirectionnelle (Bai *et al*. 2015), et les cristaux vont alors s'aligner verticalement et horizontalement. La congélation radiale peut être réalisée à l'aide d'un moule en cuivre, et la solution ou la suspension va alors être soumise à deux gradients de température, l'un le long de l'axe Z du moule et l'autre dans la direction radiale, ce qui entraîne l'alignement longitudinal et radial des cristaux (Su *et al*. 2019). Enfin, des facteurs externes peuvent également être appliqués, comme un champ magnétique en présence de polymère ou de métal ferromagnétique (Niksiar *et al*. 2019), un champ électrique, ou des ultrasons. Les différentes morphologies de pores permettent de former des micro-canaux au sein des matrices, favorisant ainsi la prolifération de cellules endothéliales dans des zones choisies du matériau (Kämäräinen *et al*. 2022).

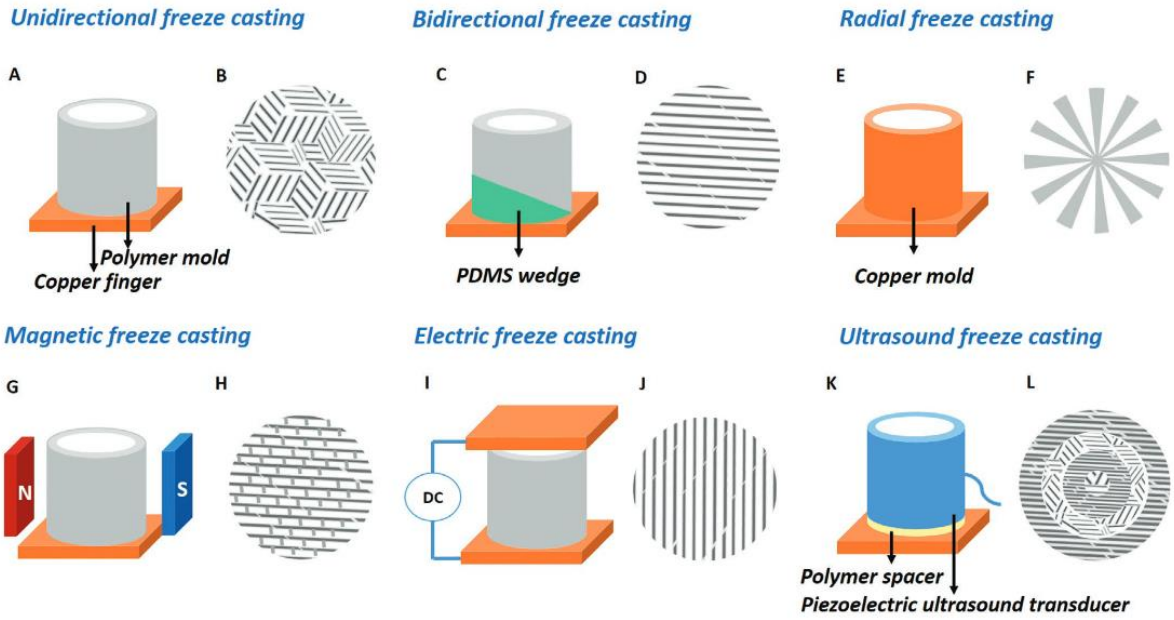


Figure 45 : Schémas représentant les techniques de *Freeze casting* et les microstructures correspondantes des échafaudages résultants (Shao *et al*. 2020).

Technique de congélation unidirectionnelle (**A** et **B**), bidirectionnelle (**C** et **D**), radiale (**E** et **F**), magnétique (**G** et **H**), électrique (**I** et **J**) et par ultrasons (**K** et **L**).

IV. Stratégies d'amélioration des propriétés des biomatériaux.

Bien que les biomatériaux soient de plus en plus élaborés et permettent de favoriser la colonisation cellulaire *in vitro*, il est possible d'y associer des protéines, des facteurs de croissance et/ou des peptides bioactifs qui vont faciliter leur intégration *in vivo* avec les tissus environnants. Ces stratégies sont d'autant plus importantes à l'interface biomatériau/milieu biologique pour maintenir des fonctions cellulaires optimales. L'interface cellule/matériaux associe des processus complexes tels que l'adsorption de protéines à leur surface, la colonisation cellulaire, la production de différents facteurs de croissance stimulant le recrutement cellulaire.

Dans certaines conditions, ces procédés peuvent conduire à la formation d'une capsule fibreuse pouvant entraîner une nécrose cellulaire et tissulaire (Figure 46).

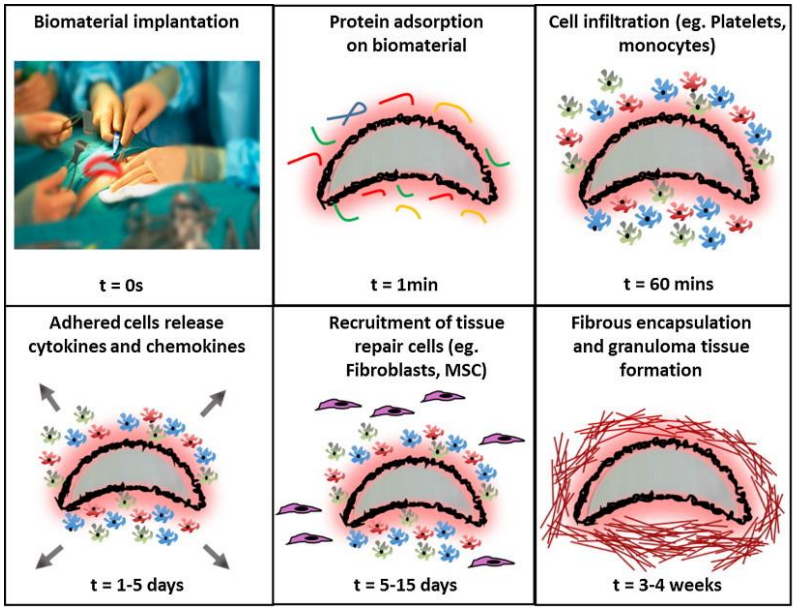


Figure 46 : Réponse immunitaire innée naturelle suite à l'implantation d'un biomatériau (Sridharan *et al*. 2015).

Rapidement après implantation, une couche de protéines du système vasculaire environnant s'adsorbe sur la surface du biomatériau. Cela conduit à l'infiltration et à l'adhérence de cellules telles que les plaquettes, les monocytes et les macrophages. Ces cellules libèrent à leur tour des cytokines et des chimiokines qui recrutent des cellules de réparation tissulaire tels que les fibroblastes ou les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) vers le site de l'inflammation. Ces cellules déposent une matrice de collagène et encapsulent le biomatériau dans une couche de tissu fibreux.

Pour améliorer les propriétés des biomatériaux, des stratégies ont été développées pour offrir un microenvironnement permettant la croissance et la différenciation cellulaire. Elles visent à mimer la MEC, qui est composée d'un réseau de protéines fibreuses (tels que collagène et l'élastine), et la production d'une matrice composée de laminine, de collagène et de fibronectine, emprisonnées dans un réseau de protéoglycanes et glycoprotéines. La MEC fournit un réseau permettant à la fois le support mécanique et l'ancrage des cellules. Elle a l'avantage de transmettre les forces mécaniques pour limiter la déformation des tissus.

Toutes les protéines structurelles de la MEC possèdent un ou plusieurs domaines bioactifs qui peuvent se lier soit aux récepteurs de la surface cellulaire, soit à d'autres protéines structurelles ou de connexion, soit à des molécules de signalisation telles que des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines et des protéases matricielles. Différentes stratégies visent à incorporer ces composants ou une partie de ces composants de la MEC dans les biomatériaux. Ils peuvent être soit associés au sein des matrices, soit fixés de manière covalente.

Dans les parties suivantes, nous présenterons les procédés visant à incorporer des facteurs de croissances ainsi que des peptides bioactifs présentant des séquences reconnues par les cellules qui favorisent la réparation osseuse.

4.1. Facteurs de croissance.

Les facteurs de croissance permettent de stimuler la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire, en se liant à leurs récepteurs transmembranaires et en transmettant des signaux intracellulaires qui peuvent stimuler des fonctions cellulaires particulières (Figure 47).

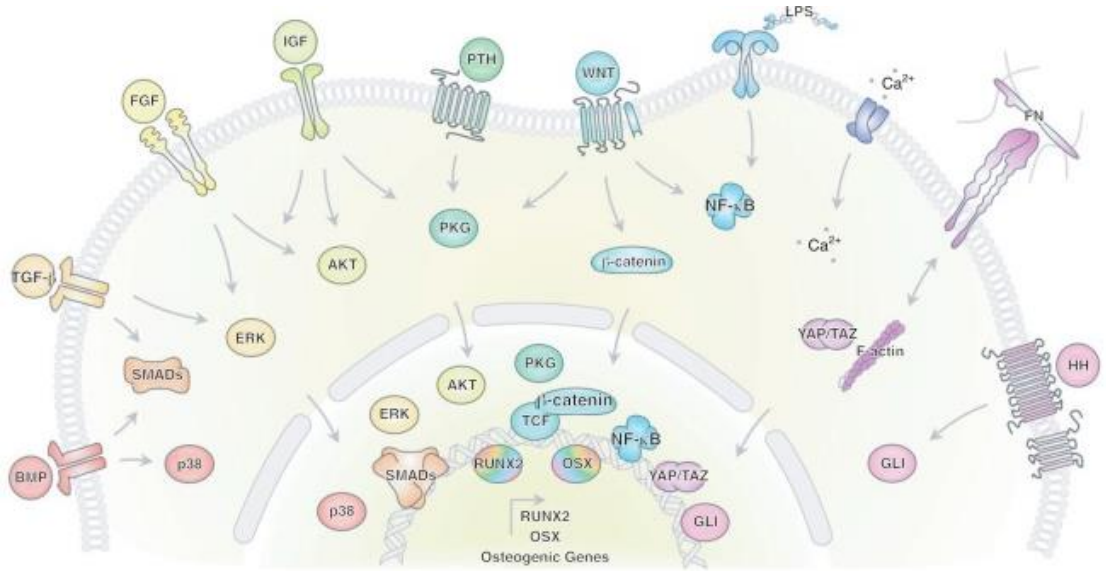


Figure 47 : Facteurs impliqués dans l'ostéogenèse (Dhawan *et al*. 2022).

Les principaux ligands impliqués dans la voie ostéogénique, les kinases de transduction de signal associées, ainsi que les facteurs de transcription sont mis en évidence. Les régulateurs de la différenciation des ostéoblastes RunX2 et Osx régulent essentiellement l'ostéogenèse en coordination avec d'autres facteurs de transcription, dans ce schéma : la voie des BMPs, TGF-β, FGF, IGF (facteur de croissance analogue à l'insuline), PTH (hormone parathyroïdienne), WNT, LPS (lipopolysaccharide), ions calcium (Ca^{2+}), FN (fibronectine) et HH (hedgehog). Les principaux transducteurs de signal en aval comprennent les SMADs, les protéines kinases activées par les mitogènes p38 et ERK, AKT (RAC sérine/thréonine-protéine kinase ou protéine kinase B), PKC (protéine kinase C), β-caténine, NF-κB (amplificateur de la chaîne légère kappa du facteur nucléaire des lymphocytes B activés), ions Ca^{2+}, protéine associée à oui (YAP)/tafazzine (TAZ), actine filamenteuse (F) et GLI (oncogènes associés au gliome).

Les facteurs de croissance les plus utilisés pour la réparation osseuse sont les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs), le facteur de croissance transformant (TGF-β), le facteur de

croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). Ils sont naturellement présents aux sites de fractures et jouent un rôle prépondérant lors de la réparation osseuse (Figure 47).

4.1.1. Rôle des BMP et du FGF dans la formation osseuse.

Il existe une vingtaine de BMPs différentes sécrétées naturellement par les ostéoblastes, dont la plupart font partie de la famille des protéines TGF-β. Parmi elles, les BMP-2, -4, -5, -6 et -7 ont été identifiées comme étant impliquées dans la différenciation ostéogénique (Riley *et al*. 1996). Elles permettent la différenciation des MSCs en ostéoblastes, favorisant ainsi la formation osseuse. Les BMP-2 et BMP-7 ont été particulièrement étudiées et sont aujourd'hui intégrées dans des dispositifs de régénération osseuse approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) depuis 2002. Ces dispositifs sont commercialisés sous les noms de Osigraft® et Inductos®.

Plus spécifiquement, des modèles *in vitro* de culture cellulaire ont permis de montrer que l'expression des marqueurs ostéogéniques tels que Runx2 et l'ALP est augmentée, et que la synthèse de collagène de type I et d'ostéocalcine est stimulée par la BMP (Liu, Gao, *et al*. 2007, p.2).

L'utilisation de BMP-2 recombinante est toutefois limitée par sa courte durée de vie. Pour pallier ce problème, de fortes doses sont utilisées dans les applications thérapeutiques en précliniques et cliniques. En effet, en conditions physiologiques, les facteurs de croissance sont incorporés à l'échelle du nanogramme par millilitre alors que les études précliniques *in vivo* montrent une utilisation de ces facteurs à des concentrations de plusieurs microgrammes par millilitre (Gothard *et al*. 2014). Ces doses peuvent provoquer des effets secondaires indésirables tels que le développement de cancers (Carragee *et al*. 2013), une minéralisation ectopique, une inflammation et une résorption osseuse excessive (James *et al*. 2016). L'utilisation de BMP-2 dans la réparation des fusions antérieures de la colonne cervicale a notamment provoqué des gonflements anormaux des tissus cervicaux et mous ainsi qu'une atteinte des voies respiratoires, ce qui a nécessité une réintervention chirurgicale (Fu *et al*. 2013). Bien que la BMP ait été approuvée par la FDA pour des applications cliniques, en 2008 une note a été publiée pour mieux encadrer son utilisation (Daniel G. Schultz 2008).

Moins fréquemment, les FGF ont été utilisés pour améliorer la réparation osseuse. Les membres de cette famille sont des facteurs de croissance polypeptidiques à chaîne unique de 20 à 35 kDa. L'injection de FGF recombinant dans des fractures du péroné a montré une amélioration de la réparation osseuse, avec une augmentation du volume et de la teneur en minéraux des cals osseux, et ce de manière dose-dépendante (Kawaguchi *et al*. 1994). Par ailleurs, le FGF permet d'améliorer l'efficacité de la BMP-2 lorsqu'ils sont associés, et cette synergie permet d'utiliser la BMP-2 à de plus faibles doses (Kuhn *et al*. 2021).

4.1.2. Rôle du VEGF dans l'angiogenèse.

Lors de l'implantation *in vivo* d'un biomatériau, l'un des défis majeurs est de promouvoir la viabilité des cellules au sein du greffon. Cette viabilité cellulaire dépend de la rapidité à laquelle les vaisseaux sanguins de l'hôte vont envahir le greffon. Pour améliorer le développement des vaisseaux sanguins, des stratégies utilisent le VEGF pour son effet chimio-attractif sur les cellules endothéliales.

Le VEGF est un facteur de croissance majeur spécifique des cellules endothéliales, comme vu dans le paragraphe 1.3.3. C'est une glycoprotéine dimérique favorisant la prolifération des cellules endothéliales, mais qui permet aussi de stimuler l'ostéogenèse par la régulation des facteurs de croissance ostéogéniques (Schipani *et al*. 2009). Le VEGF peut également réguler l'expression des BMP dans les cellules endothéliales, induisant une différenciation ostéogénique et une minéralisation de la matrice (Grosso *et al*. 2017). Ce couplage VEGF/BMP est largement décrit dans la littérature pour son intérêt en ingénierie osseuse.

Toutefois la surexpression du VEGF peut également entraîner une résorption osseuse due à un recrutement excessif d'ostéoclastes, et affecter directement la différenciation des ostéoblastes (Helmrich *et al*. 2013). Il est ainsi nécessaire d'améliorer la disponibilité du VEGF ainsi que sa cinétique de délivrance au site lésé.

4.1.3. Rôle de la semaphorine 3A dans l'innervation.

Nous avons précédemment évoqué le rôle des neuropeptides libérés par les neurones sensoriels lors de lésions osseuses, tels que le CGRP ou la SP. Des stratégies utilisant d'autres facteurs neurotrophiques comme le facteur de croissance NGF ou encore la sémaphorine 3A (Sema3A) permettraient de stimuler l'innervation pour une réparation osseuse plus efficace.

Hayashi et ses collaborateurs (Hayashi *et al*. 2012) ont précédemment montré que la Sema3A inhibe la différenciation des ostéoclastes et favorise la formation osseuse par les ostéoblastes, ce qui en fait un facteur de choix pour des stratégies de réparation. McCormick et ses collaborateurs (McCormick *et al*. 2013) ont montré que les neuropeptides NGF et Sema3A greffés sur un hydrogel de chitosan permettent d'augmenter la longueur des neurites de neurones issus de DRG (*Dorsal Root Ganglia*), à la différence de ces mêmes neuropeptides simplement dissous ou adsorbés dans l'hydrogel. Le mode d'intégration de ces neuropeptides est donc important pour permettre leur reconnaissance par les cellules (Qasim *et al*. 2020). Le greffage est à privilégier afin de maintenir les facteurs de croissance dans leur conformation active.

Pour améliorer l'ostéointégration de matériaux à base de titane, Fang et ses collaborateurs (Fang *et al*. 2014) ont réalisé des revêtements de Sema3A sur des implants en titane. L'adhésion cellulaire, la viabilité ou l'arrangement du cytosquelette n'ont pas été modifiés par la présence de Sema3A, alors

que l'expression des gènes ostéogéniques (Runx2, ALP et OCN) a été augmentée, indiquant que l'incorporation de Sema3A permettait une réparation osseuse plus rapide.

Pour conclure ce paragraphe, bien que l'utilisation de facteurs de croissances ait montré des potentiels thérapeutiques intéressants, avec notamment une augmentation de 50 à 96 fois de la réparation osseuse, pour respectivement BMP2 et BMP7 (Gothard *et al*. 2014), leur utilisation à forte concentration peut induire des complications graves. Mimer le processus de réparation naturelle en combinant des facteurs angiogéniques, neuronaux, chondrogéniques et ostéogéniques récapitulant les signaux environnementaux natifs, ainsi que le contrôle de leur libération séquentielle, permettrait d'améliorer les stratégies actuelles (Gothard *et al*. 2014).

4.2. Peptides bioactifs.

Pour apporter des fonctions supplémentaires aux matériaux et aux systèmes de délivrance de principes actifs, il est possible d'incorporer des séquences peptidiques connues pour stimuler des fonctions spécifiques.

Les peptides courts, inférieurs à 50 acides aminés, sont facilement obtenus par synthèse chimique en phase solide. Ils peuvent également être obtenus par des techniques plus récentes telle que la ROP (*Ring Opening Polymerisation*). Par ailleurs, l'utilisation de séquences peptidiques courtes est avantageuse comparativement aux protéines entières car elles sont plus stables, peuvent être facilement synthétisées, et sont moins susceptibles de présenter un fort encombrement stérique (Hersel *et al*. 2003).

Les premiers peptides ont été découverts par des méthodes de fragmentation et d'isolement à partir de produits naturels. Des méthodes plus récentes, comme le criblage à haut débit basé sur l'analyse de bases de données de protéines, ont permis d'identifier de nouvelles séquences clés, et de déterminer leurs liaisons à des substrats particuliers tels que les récepteurs cellulaires.

Ces peptides peuvent apporter de la bioactivité aux biomatériaux. Par bioactivité, on entend que le matériau va permettre d'accélérer des processus de réparation tissulaire, en interagissant directement avec le tissu cible. Une liste non exhaustive des principaux peptides utilisés en ingénierie osseuse sera donnée dans les paragraphes suivants.

4.2.1. Les peptides d'adhésion cellulaire.

Pour améliorer les propriétés à la surface des biomatériaux, et ainsi faciliter leur intégration dans les tissus périphériques, la première étape est de permettre l'adhérence des cellules. L'adhésion cellulaire comprend l'ensemble des mécanismes qui permettent aux cellules de se lier entre elles ou à des surfaces. Elle est essentielle à l'intégrité des cellules, à leur communication et leur croissance. Parmi les molécules d'adhésion, les intégrines ont été particulièrement étudiées. Elles interagissent avec les composants de la MEC comme les laminines, le collagène ou encore la fibronectine pour permettre l'ancrage cellulaire. Des peptides retrouvés sur la séquence de la laminine comme le RGD, IKVAV et YIGSR sont présentés ci-après.

4.2.1.1. Le motif RGD.

La séquence de reconnaissance d'adhésion cellulaire la plus utilisée dans les biomatériaux est le motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique), ou parfois le RGDS possédant une serine supplémentaire. Ce motif est présent dans la plupart des protéines de la MEC telles que la laminine, le collagène, la sialoprotéine osseuse, la fibronectine et l'ostéopontine (Ruoslahti & Pierschbacher 1987).

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires d'adhésion cellulaire dont l'une des extrémités interagit avec des protéines de la matrice extracellulaire. Elles dépendent de cette séquence RGD pour l'ancrage cellulaire, et la forte affinité des intégrines pour ce tripeptide est due à sa conformation qui contient une boucle (Ruoslahti 1996). Cette liaison du motif RGD aux intégrines peut faciliter l'ancrage des cellules sur les biomatériaux.

La reconnaissance de ce motif par les cellules est essentielle. Des travaux ont étudié l'influence de la longueur du bras espaceur entre l'hydrogel et le peptide RGD sur l'adhésion cellulaire. Lee et ses collaborateurs (Lee *et al*. 2016) ont utilisé un revêtement hydrogel à base d'alginate pour répartir de manière périodique des peptides RGD. Ces peptides ont été disposés en faisant varier la longueur du bras espaceur entre l'hydrogel et le motif RGD, et en faisant varier la densité d'insertion de ce peptide. L'adhésion de cellules pré-ostéoblastiques sur ces surfaces a ensuite été évaluée. Lorsque la concentration en peptides RGD augmente et que le bras espaceur est long, l'adhésion cellulaire est améliorée. Il semble que plus le bras est long et plus le motif RGD est reconnu par les cellules. Un espacement de 50 nm entre les points de réticulation de RGD favorise l'étalement et la prolifération optimale des cellules.

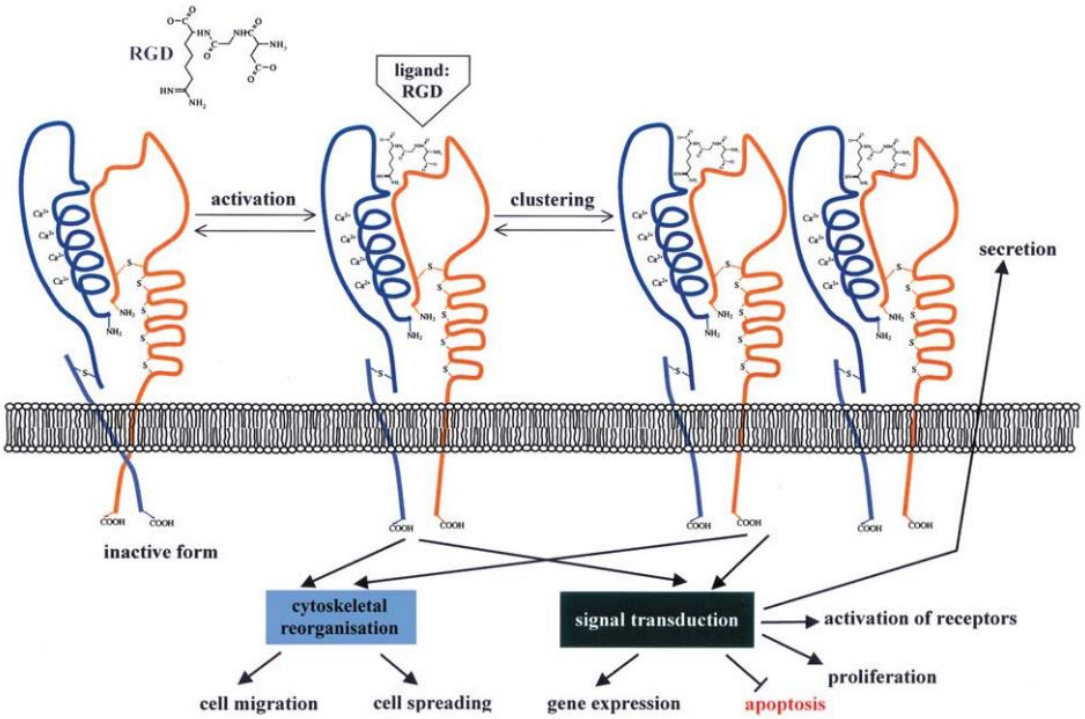


Figure 48 : Schéma de la liaison du peptide RGD à une intégrine et voies de signalisation pouvant être activées (Schaffner & Dard 2003).

La conformation de ce peptide a également un rôle important. Verrier et ses collaborateurs (Verrier *et al*. 2002) ont étudié le rôle de différents peptides contenant le motif RGD sous forme linéaire ou cyclique dans l'adhésion cellulaire sur des surfaces recouvertes de protéines de la MEC. Le but de cette étude était d'identifier un candidat peptide capable d'augmenter le potentiel d'adhésion des MSCs à un substitut osseux tel que le titane pour améliorer son ostéointégration. Les auteurs ont montré que les peptides RGD cycliques présentent une activité plus élevée par rapport aux peptides RGD linéaires. Les peptides cycliques ont une structure 3D moins flexible, ce qui leur permet de se lier aux récepteurs des intégrines avec une plus grande affinité.

4.2.1.2. Les motifs IKVAV et YIGSR.

Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques. Elles sont composées par l'assemblage de 3 chaînes polypeptidiques nommées α, β et γ, qui sont codées par des gènes distincts. Elles sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Les laminines ont une morphologie en croix asymétrique avec trois bras courts et un bras long (Figure 49). Elles possèdent des séquences spécifiques permettant l'adhésion cellulaire, parmi lesquelles le motif RGD précédemment évoqué, le peptide IKVAV (Isoleucine-Lysine-Valine-Alanine-Valine) et le peptide YIGSR (Tyrosine-Isoleucine-Glycine-Serine-Arginine).

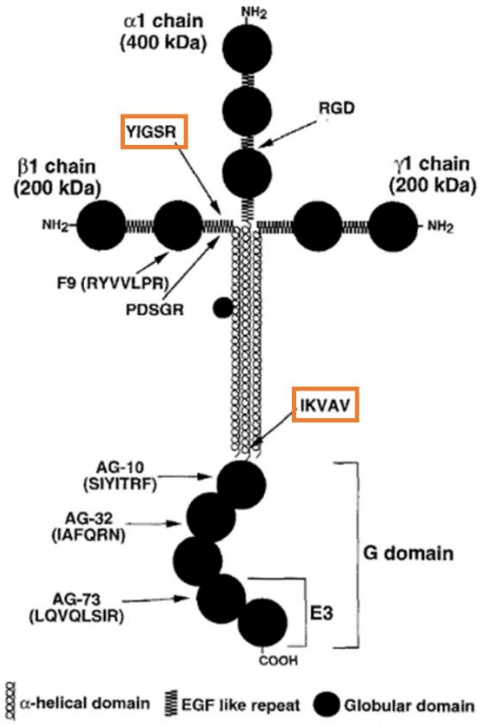


Figure 49 : Modèle représentant la structure en croix de la Laminine 1 (Nomizu 1998).

Les positions des domaines de liaisons aux cellules sont indiquées par des flèches. Les positions des peptides IKVAV sur la chaîne α et YIGSR sur la chaîne β sont encadrés.

4.2.1.2.1. Le peptide IKVAV.

Le peptide IKVAV est présent sur la chaîne α de la laminine au niveau de l'extrémité C-terminale du bras long. Il est impliqué dans différentes activités biologiques telles que la promotion de l'adhésion cellulaire, la croissance des neurites des neurones sensoriels, l'angiogenèse, la production de collagénase IV ou encore la croissance tumorale (Kanemoto *et al*. 1990; Tashiro *et al*. 1989).

Le peptide IKVAV est connu pour son rôle dans la croissance et la prolifération des MSCs en permettant la transduction du signal par activation des voies MAPK/ERK (Li *et al*. 2014). Ce peptide est utilisé en bioingénierie pour sa capacité à faciliter la différenciation des cellules progénitrices neurales en neurones. Il permet également une croissance améliorée des neurites lorsqu'il est introduit dans des hydrogels (Silva *et al*. 2004). Dans cette étude, Silva et ses collaborateurs (Silva *et al*. 2004) ont étudié la réponse des cellules progénitrices neuronales murines (NPCs) à des hydrogels autoassemblés à base de peptide IKVAV, ou à des revêtements de laminine et de poly-D-lysine, protéines classiquement utilisées pour la culture des neurones (Figure 50). En présence d'IKVAV, la quantité de cellules exprimant la β III tubuline était significativement plus importante dès le premier jour de culture. Après 7 jours, il y avait 2,5 fois plus de cellules exprimant le marqueur neuronal β III tubuline (Figure 50F) en présence d'IKVAV comparativement à ceux qui en étaient dépourvus. Par ailleurs, les neurites étaient également beaucoup plus longs (Figure 50B et C).

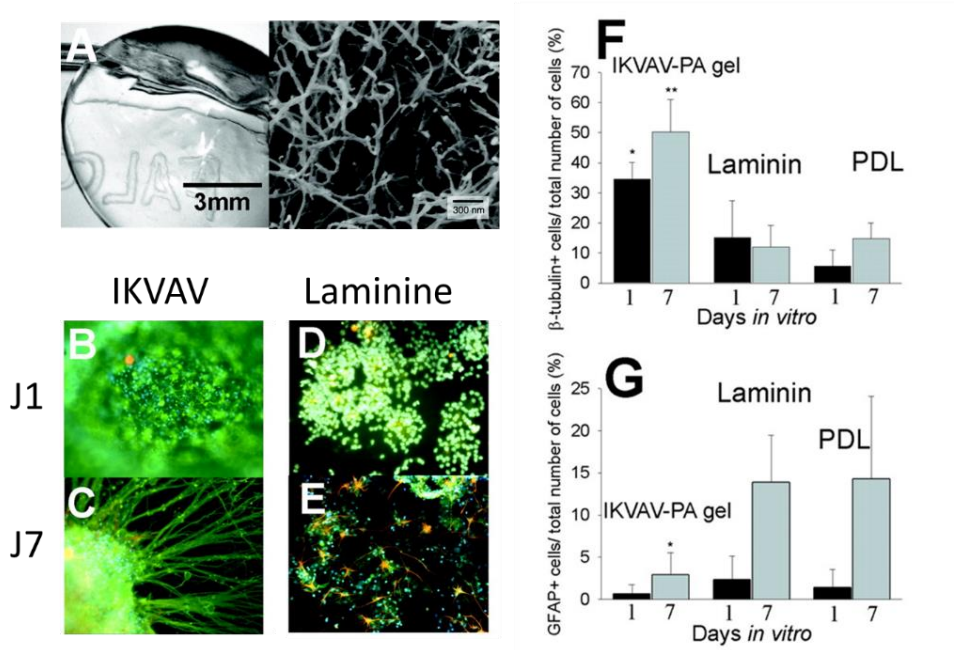


Figure 50 : Structure d'un hydrogel à base de peptide IKVAV et culture de cellules neuronales sur ces gels, adapté de Silva *et al.*, 2004.

Des cellules progénitrices neurales murines (NPC) ont été cultivées dans des gels autoassemblés en nanofibres de peptide IKVAV ou sur des plaques revêtues de la laminine ou de la Poly-D-Lysine (PDL) pendant 1 et 7 jours. (**B**, **C**, **D** et **E**) Immunocytofluorescence des neurones différenciés marqués pour la β III tubuline en vert et des astrocytes marqués pour le GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) en orange. Quantification du nombre de cellules positives pour la β III tubuline (**F**) et la GFAP (**G**).

4.2.1.2.1. Le peptide YIGSR.

Il est connu depuis une trentaine d'années que le peptide YIGSR permet l'adhésion cellulaire lorsqu'il est fixé de manière covalente à une surface (Sp *et al*. 1993). Récemment, il a été montré que le peptide YIGSR interagit avec une protéine membranaire fortement exprimée par les cellules endothéliales. Cette protéine de 67 kDa est nommée 67LR (*67 kDa Laminin Receptor*) (Montuori *et al.*, 2016). Ren et ses collaborateurs (Ren *et al.*, 2014) ont étudié le comportement de migration des cellules endothéliales (ECs) et des cellules musculaires lisses vasculaires (SMCs) selon un gradient croissant en YIGSR. La vitesse de migration des ECs a été multipliée par 5 dans le sens du gradient, alors que la mobilité des SMCs n'a pas été influencée. Ainsi, le peptide YIGSR permettrait un guidage sélectif de la migration des ECs.

4.2.2. Sites de dégradation reconnus par les métalloprotéinases (MMPs).

Toutes les protéines peuvent être dégradées par des protéases. Ces protéases sont essentielles au maintien de l'homéostasie protéique des cellules. Les sites de coupure des protéases ont des spécificités variables. Il est donc possible d'intégrer des séquences peptidiques de clivage dans un biomatériau pour en améliorer la dégradation et favoriser l'invasion cellulaire.

Il est possible de développer des biomatériaux à base de polypeptides sensibles à la protéolyse par l'incorporation d'une ou plusieurs séquences « substrats » des métalloprotéinases matricielles (MMPs). Ces enzymes font parties de la famille des MMPs et des collagénases, qui sont associées à la dégradation de la matrice extracellulaire. Il existe 28 endopeptidases dans cette famille ayant des spectres protéolytiques assez larges et se recouvrant, ce qui permet la dégradation de l'ensemble des composants de la MEC.

Les MMPs sont classées selon leur structure en matrilysines (MMP1 et 26), collagénases interstitielles (MMP1, 8 et 13), stromélysines (MMP3, 10 et 11), gélatinases (MMP2 et 9), et métalloprotéinases membranaires (MMP14, 15, 16, 17, 24 et 25) (Chantrain & DeClerck 2002). Les MMPs clivent le collagène après le résidu Gly de la séquence triplet Gly -[Ile/Leu]-[Ala/Leu] à une position unique le long de la chaîne peptidique (Xiao *et al*. 2010) (Figure 51).

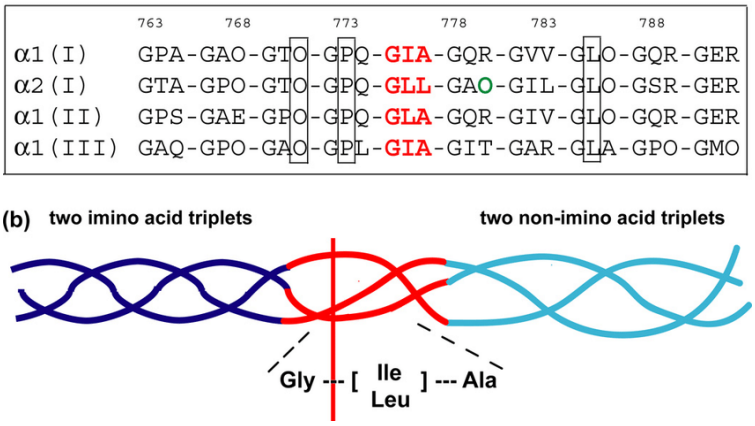


Figure 51 : Sites de clivage de la collagénase dans les collagènes humains de type I et III (Xiao *et al*. 2010).

Le collagène est constitué de trois chaînes hélicoïdales qui vont s'enrouler entre elles pour former une super-hélice. Le triplet contenant la liaison clivable est coloré en rouge. Les résidus conservés dans les deux triplets précédant immédiatement les sites de clivage sont mis en évidence dans l'encadré.

L'enzyme MMP2 (*Matrix Metalloproteinase 2*) est aussi connue sous les noms de gélatinase A et de collagénase IV. Cette enzyme est une endopeptidase ubiquitaire sécrétée au cours de différents processus tels que le remodelage du système vasculaire, l'angiogenèse, la réparation tissulaire, l'invasion tumorale, l'inflammation et la rupture de la plaque d'athérosclérose. Son rôle est de dégrader le collagène dénaturé. Des mutations dans le gène codant pour la MMP2 induisent des ostéolyses héréditaires, des syndromes de « disparition osseuse » et des arthrites (Martignetti *et al*. 2001). Son rôle dans la dégradation de la matrice osseuse est donc primordial.

Il a été montré que la MMP2, produite par les cellules endothéliales, favorise à la fois la migration et le regroupement des cellules souches nerveuses (Matta *et al*. 2021). Par ailleurs, les travaux de l'équipe BIOTIS ont montré que la co-culture de cellules endothéliales avec des neurones sensoriels augmente significativement la quantité de protéines et l'activité enzymatique de la MMP2 (Leroux *et al*. 2020).

Le développement d'un biomatériau favorisant l'adhérence et la prolifération de cellules endothéliales et de fibres nerveuses pourrait permettre d'augmenter l'activité enzymatique de la MMP2. Chau et ses collaborateurs (Chau *et al*. 2008) ont montré que la séquence PVG↓LIG est clivable par les MMP2 et MMP9 (↓ indique le site de coupure). La conformation locale et la dynamique de l'isoleucine jouent un rôle majeur dans la reconnaissance de ce site de clivage (Xiao *et al*. 2010).

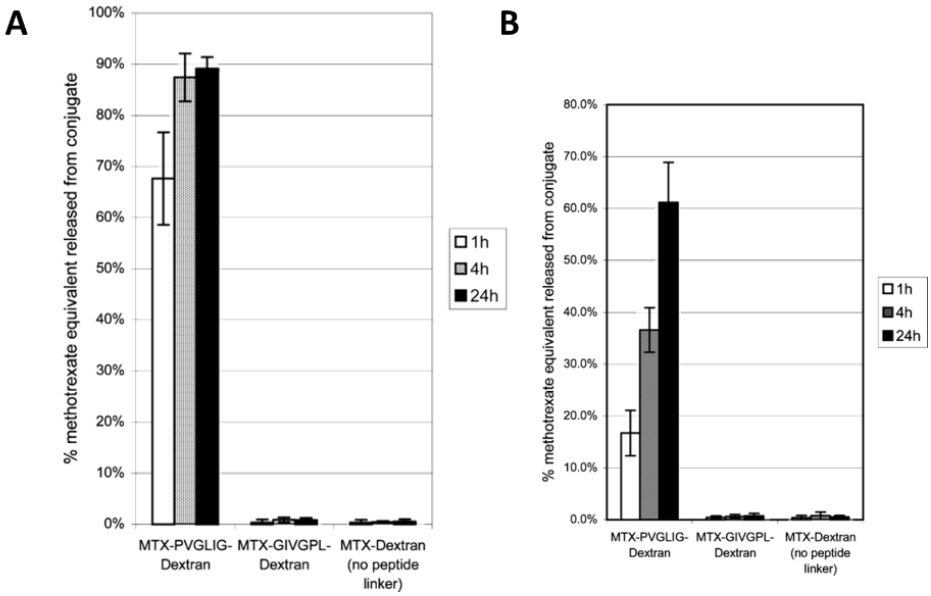


Figure 52 : Relargage de la méthotrexate libérée à partir de différents conjugués en présence de MMP2 (A) ou MMP9 (B) (Chau *et al.* 2004).

Des conjugués MTX-PVGLIG-Dextrane, MTX-GIGVPL-Dextrane (séquence inversée du PVGLIG n'ayant pas de fonction biologique connue) et MTX-Dextrane ont été synthétisés. Ces conjugués ont été incubés avec 10 nM de l'enzyme MMP-2 et -9 à 37°C afin d'observer le relargage de MTX, et le MTX libéré a été mesuré. Il était significativement plus important en présence du site de clivage PVGLIG que celle de son analogue inversé ou en absence de peptide. La séquence PVGLIG semble plus spécifique de l'enzyme MMP-2 (≈90% de relargage) que de la MMP-9 (≈60 % de relargage à 24 h). Le clivage du conjugué par la MMP-2 et -9 dépend de la composition du lieur. **MTX** = méthotrexate.

4.2.3. Les peptides de nucléation du phosphate de calcium.

L'incorporation d'une composante minérale dans les matériaux, et notamment dans les hydrogels, peut s'avérer complexe. En effet, les minéraux comme l'HA peuvent sédimenter en solvant aqueux et donc ne pas se répartir de façon homogène dans le biomatériau.

D'un point de vue biochimique, les phosphoprotéines permettent de stabiliser le calcium et d'éviter sa précipitation. Dans la cavité buccale, la teneur en minéraux des dents est stabilisée par les phosphoprotéines de la salive, parmi lesquelles les stathérines, les histatines et les protéines acides riches en proline (PRP) (Zhang *et al*. 2021). La stathérine salivaire est une phosphoprotéine acide riche en proline qui lie en particulier les particules d'HA en favorisant la liaison avec les ions calcium (Bennick 1982).

Raj et ses collaborateurs (Raj *et al*. 1992) ont étudié l'affinité de différents peptides issus de la stathérine pour des particules d'HA. Différents peptides ont été synthétisés chimiquement (Figure 53A). Les 15 premiers acides aminés présents à l'extrémité N-terminale de la stathérine, D**SS**EEKFLRRIGRFG sont des résidus chargés négativement. Ce peptide est appelé SN15. La partie soulignée correspond à la partie permettant l'adsorption des particules d'HA. Cette séquence est composée d'acides aminés structurés en hélice α. Les sérines (S, en gras) sont phosphorylées.

Parmi les peptides synthétisés, le peptide SNS15 est identique au peptide SN15 mais les résidus de sérine le constituant ne sont pas phosphorylées. Le peptide SNA15 correspond à la séquence SN15 où les sérines en position 2 et 3 sont remplacées par des acides aspartiques (D).

Le peptide SN11 ne contient pas les 4 premiers acides aminés DSSE. Le fragment SN15 a montré une adsorption maximale et l'affinité relative la plus élevée pour l'HA par rapport aux autres fragments de taille similaire (Figure 53B).

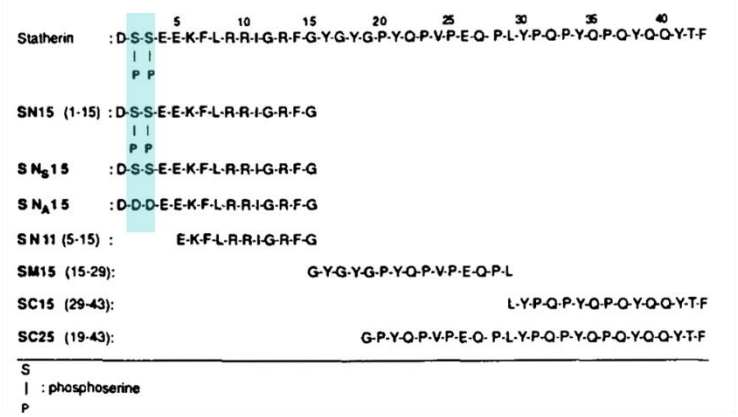
Le peptide SNA15, qui présente les résidus aspartate chargés négativement aux positions 2 et 3 à la place des phosphosérine, présente une affinité similaire à SN15 pour le HA. Les peptides en position C-terminale ont au contraire une faible affinité.

Ces données suggèrent que la densité de charges négatives globales à l'extrémité N-terminale de la stathérine est importante pour son interaction de surface avec les particules de HA. Une plus grande affinité avec l'HA des peptides SN15 et SNA15 a également été constatée comparativement à SNS15 (Luo *et al*. 2019).

D'autres peptides comme le peptide ID8 ou le P11-4 peuvent servir de nucléation aux particules de phosphate de calcium. Ces deux peptides sont enrichis en résidus acides favorisant les interactions avec le calcium. Le peptide ID8 (Li *et al*. 2022; Li *et al*. 2020) est composé de 8 acides aminés avec une alternance d'isoleucine et d'acide aspartique, et s'organise en feuillet β. Le peptide P11-4, de séquence QQRF**E**W**E**F**E**QQ, permettrait une reminéralisation de l'émail atteint de carie (de Sousa *et al*. 2019) .

D'autres peptides, tels que le peptide de croissance ostéogénique ALK (ALKRQGRTLYGF) ou encore le motif d'adhérence cellulaire de l'ostéopontine DGR (DGRGDSVAYG) (Horii *et al*. 2007) peuvent également être utilisés. Toutefois, la combinaison des séquences peptidiques au sein des biomatériaux n'est pas si aisée. De nombreuses interactions peuvent entrer en jeu et limiter la reconnaissance du motif par les enzymes ou les cellules cibles. La manière la plus simple serait de les assembler linéairement, mais des interactions intermoléculaires peuvent entrer en jeu, comme les forces de répulsion électrostatiques, les liaisons de Van der Waals, ou les liaisons hydrogènes.

A



B

Langmuir parameters for statherin and its fragments

Peptide	$K \times 10^{-5}$ (liter mol^{-1})	$N \times 10^{6}$ (mol m^{-2})
Statherin[a]	11.1	0.44
SN15(1–15)	9.1 ± 3.0	2.20 ± 0.1
SNA15	6.4 ± 3.0	2.10 ± 0.1
SNS15	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.1
SN11(5–15)	2.3 ± 0.6	0.7 ± 0.2
SM15(15–29)	0.06 ± 0.03	2.6 ± 0.5
SC15(29–43)	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.2
SC25(19–43)	0.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1

[a] Values from Johnsson *et al.* (1991).

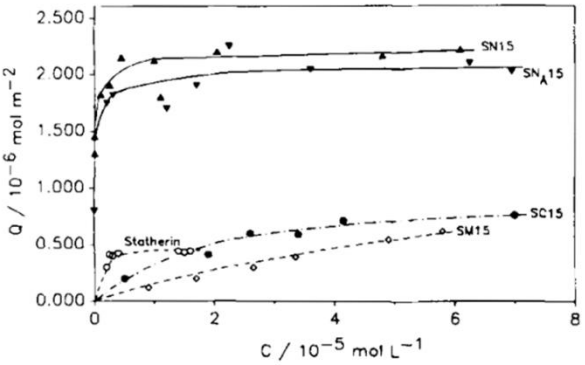


Figure 53 : Séquences primaires de la stathérine salivaire et des peptides synthétiques dérivés de la stathérine (Raj *et al*. 1992).

Les peptides issus de la stathérine ont été synthétisés chimiquement sur une résine en phase solide (**A**). Le coefficient d'affinité K (litre.mol^{-1}) et le nombre maximum de sites d'adsorption N (mol.m^{-2}), calculés en utilisant l'équation de Langmuir, sont indiqués (**B**). **Statherin** = protéine entière, **SN15** = les 15 premiers acides aminés de la statherine naturelle, **SNS15** = résidus sérine non phosphorylé, **SNA15** = substitution des phosphosérine en position 2 et 3 par des aspartate, **SN11** = délétion des 4 premiers acides aminés sur le fragment SN15.

V. Les polypeptides dérivés de l'élastine (ELPs) pour l'ingénierie tissulaire.

5.1. L'élastine naturelle.

5.1.1. Généralités sur l'élastine.

L'élastine est une protéine de la matrice extracellulaire que l'on trouve dans les tissus conjonctifs de la peau, des ligaments, des vaisseaux sanguins et des poumons (Wise & Weiss 2009). L'élastine confère à ces tissus les propriétés élastiques nécessaires à leur fonctionnement normal (Kristensen & Karsdal 2016). Les fibres constituées d'élastine sont très stables, fonctionnellement et structurellement, avec une demi-vie d'environ 70 ans. L'élastine possède des domaines hydrophobes constitués de motifs répétités VPGG, VPGVG et APGVGV (Figure 54). Ces derniers forment des structures secondaires en coudes-β, tandis que le reste de la protéine est plutôt non structuré.

GVPGAIPGGVPGGVFYPGAGLGALGGGALGPGGKPLKPVPGGLAGAGLGAGLGAFPAVTFPGALVPGGVADAAAAYKAAKAGAGLGGVPGVGGLGVSAGAV
VPQPGAGVKPGKVPGVGLPGVYPGGVLPGARFPGVGVLPGVPTGAGVKPKAPGVGGAFAGIPGVGPFGGPQPGVPLGYPIKAPKLPGGYGLPYTTGKLPYGYG
PGGVAGAAGKAGYPTGTGVGPQAAAAAAAAKAAAKFGAGAAGVLPGVGGAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTPAAAAAAAAAAAKAAKYGAAAGLVPGGPGFGP
GVVGVPGAGVPGVGVPGAGIPVVPGAGIPGAAVPGVVSPEAAAKAAAKAAKYGARPGVGVGGIPTYGVGAGGFPGFGVGVGGIPGVAGVPGVGGVPGVGG
VPGVGISPEAQAAAAAKAAKYGAAGAGVLGGLVPGPQAAVPGVPGTGGVPGVGTPAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGV
GVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGGVAAAAKSAAKVAAKAQLRAAAGLGAGIPGLGVGVGVPGLGVGAGVPGLGVGAGVPGFGAGADEGVRRSLSPELREGDPS
SSQHLPSTPSSPRVPGALAAAKAAKYGAAVPGVLGGLGALGGVGIPGGVVGAGPAAAAAAAKAAAKAAQFGLVGAAGLGGLGVGGLGVPGVGGLGGIPPAAA
AKAAKYGAAGLGGVLGGAGQFPLGGVAARPGFGLSPIFPGGACLGKACGRKRK

Figure 54 : Structure primaire de l'élastine humaine (Uniprot : P15502).

La séquence primaire de l'élastine humaine révèle l'organisation en domaines ordonnés (orange) et désordonnés (noir). La présence du motif pentapeptidique VPGXG est représenté en bleu et est le motif constitutif des ELP.

5.1.2. Synthèse de l'élastine et élastogenèse.

La formation des fibres d'élastine, connue sous le nom d'élastogenèse, commence pendant la gestation, puis atteint son niveau maximal vers la naissance et se termine dans les premières années de la vie (Keeley 1979). Dans les tissus adultes, pratiquement aucune nouvelle fibre d'élastine n'est formée (Wagenseil & Mecham 2009), à l'exception de l'utérus lors de la gestation (Starcher & Percival 1985). En effet, durant la gestation l'utérus augmente de volume, passant de 50 g à 1,5 kg (Artal-Mittelmark 2021). Le niveau d'élastine va alors être augmenté de 300 fois puis se réduire dans les cinq jours suivant l'accouchement (Starcher & Percival 1985). L'élastine n'est pas renouvelée au cours de la vie et se dégrade durant le vieillissement, ce qui a pour conséquence une moindre élasticité des tissus ce qui provoque notamment l'apparition des rides sur la peau (Lefevre & Rucker 1980).

La formation de la fibre d'élastine est un processus complexe (Figure 55), comprenant une multitude d'étapes, dans lesquelles la tropoélastine joue un rôle clé (Wise & Weiss 2009). Cette molécule est le précurseur des réseaux d'élastine insolubles. Elle contient principalement des acides aminés non polaires, disposés alternativement dans des domaines hydrophobes et hydrophiles (Figure 54). Dans les domaines hydrophobes se trouvent des motifs de séquences répétées qui confèrent l'élasticité à la

protéine et contribuent à la signalisation cellulaire. Les domaines hydrophiles sont riches en lysine et permettent la réticulation des fibres élastiques. Leur oxydation se fait par les lysyl oxydases qui sont sécrétées par les cellules épithéliales, permettant la formation des liaisons covalentes entre les chaînes de monomères. Ces liaisons peuvent être des liaisons de type allysine aldol, lysinonorleucine, desmosine et isodesmosine (Schräder *et al*. 2018). La tropoélastine possède également dans sa séquence deux cystéines dans la région C-terminale, qui ont pour rôle de stabiliser la protéine par des ponts disulfures inter-chaînes (Brown *et al*. 1992).

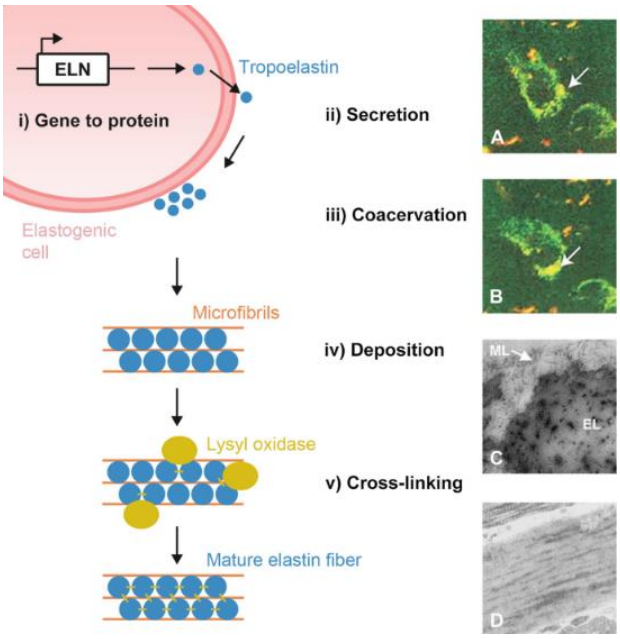


Figure 55 : Synthèse de l'élastine (Wang *et al*. 2019).

(**i**) Le gène ELN régule la production de tropoélastine dans les cellules élastogènes. (**ii**) Le précurseur tropoélastine est sécrété (**iii**) et s'agrège en assemblage qui reste à la surface de la cellule. (**iv**) Cet assemblage est recouvert de microfibrilles. (**v**) La lysyl oxydase (LOX) est recrutée et va modifier les résidus lysine de la tropoélastine, elle permet la formation de liaisons intra- et inter-moléculaires nécessaires à la formation des fibres élastiques.

La stabilité structurelle, la résilience élastique, ainsi que la capacité d'auto-assemblage de la tropoélastine ont fait de cette protéine un candidat de choix pour la fabrication de biopolymères, parmi lesquels les polypeptides analogues à l'élastine (ELPs).

5.2. Généralités sur les ELPs.

Les ELPs sont une classe de protéines artificielles dont les séquences sont dérivées du domaine hydrophobe de la tropoélastine. Cette séquence correspond à la répétition du pentapeptide $(VPGXG)_n$, où X peut être n'importe quel résidu excepté la proline, et n est le nombre de répétitions. Ainsi, il existe une multitude d'ELP différant par leurs tailles, leurs compositions, leurs fonctions et leurs assemblages. Cette variété tant quantitative que qualitative permet une multitude d'applications dans les domaines biomédicaux.

Les ELPs sont caractérisés par une température de transition de phase (Tt) ou température de point trouble (Tcp) : ils sont solubles en solution aqueuse à une température inférieure à la Tt, et forment des agrégats insolubles au-dessus cette Tt. Cette transition de phase est parfaitement réversible, ce qui permet aux ELPs de passer d'une phase à l'autre en fonction de la température ; on parle alors de thermosensibilité. Cette capacité des ELPs à subir une transition de phase inverse réversible a été exploitée à la fois pour purifier les ELPs recombinants et pour contrôler leur auto-assemblage.

5.2.1. Propriétés et structure des ELPs.

Urry et ses collègues (Urry 1997) ont réalisé les premiers travaux sur les polypeptides de type élastine. Ils ont été les premiers à synthétiser chimiquement différents types d'ELPs. Le poly (GVGVP) ou (VPGVG) a été étudié de manière plus approfondie en tant que modèle simplifié. En effet, les chaînes latérales sont soit simplement l'atome d'hydrogène (pour la glycine G), soit un groupement aliphatique (pour la valine V) et sont donc non chargées et non réactives.

5.2.1.1. Propriétés des ELPs.

Le comportement de séparation de phase des ELPs est généralement étudié en mesurant leur agrégation en fonction de la température de la solution, par des mesures de turbidité sur un spectrophotomètre UV-visible, ou par calorimétrie pour étudier la thermodynamique du processus.

Il a été démontré que les ELPs présentaient une transition de phase inverse. Comme on peut le voir sur la figure 56, le poly-$(GVGVP)_{251}$ est soluble dans l'eau en dessous de 25°C, mais une élévation de la température au-dessus de 25°C induit une séparation de phase. La mesure de la turbidité du mélange eau et (GVGVP) a mis en évidence l'apparition d'agrégats. La température critique, qui caractérise la transition, correspond à la température pour laquelle on atteint 50 % de la valeur maximale de turbidimétrie. Les auteurs ont également mis en évidence que cette Tt est localisée, c'est-à-dire que la transition est située dans la plage de 25 à 37°C, et que la chaleur de la transition est faible (inférieure à 1 kcal / mole-résidu).

Les ELPs réagissent donc thermiquement et subissent une transition de phase inverse en fonction de la température. Il a été montré que cette transition est réversible. Au-dessous de cette Tt, les chaînes de polymères sont hydratées par de l'eau de clathrate et les ELPs sont solubles en solution aqueuse.

Afin de trouver des règles qui régissent les propriétés des ELPs, différents ELPs ont été synthétisés en modifiant le résidu X dans le poly-(GXGVP) (Figure 56). Plus l'acide aminé à la position X est hydrophobe plus la Tt est basse (20-25°C), *a contrario* plus il est hydrophile plus la Tt est élevée (70-80°C). Il a également été montré que la masse moléculaire de l'ELP influence la Tt : la valeur de la Tt est inversement proportionnelle au nombre de répétitions pour un pentapeptide donné. De plus, la Tt est également dépendante de la concentration de l'ELP : plus le mélange est concentré plus elle sera basse.

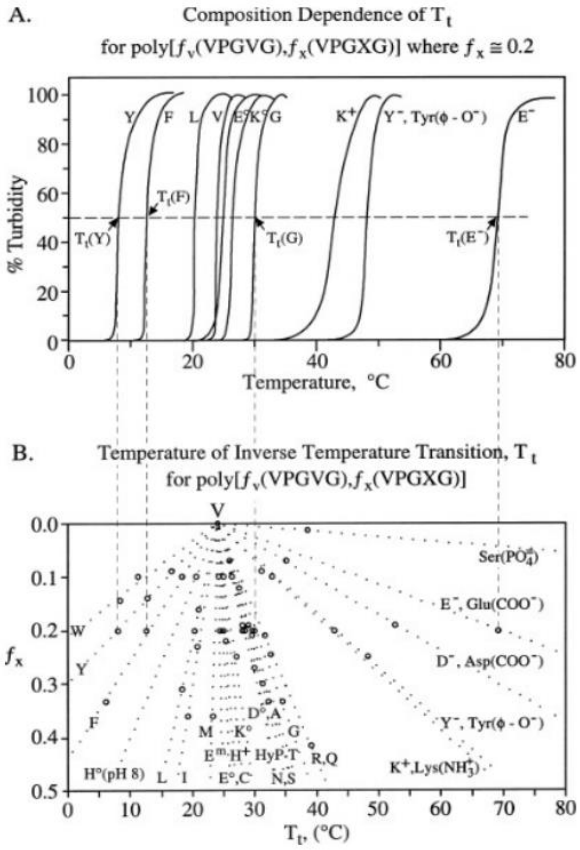


Figure 56 : Effet de la modification de l'acide aminé à la position X sur la turbidité (A) et la température inverse de transition des ELP (B) (Urry 1997).

Les ELP ont été obtenus par synthèse chimique, chaque Tt a été mesurée dans une solution saline tamponnée au phosphate (NaCl 0,15 N et phosphate 0,01 M) afin d'obtenir une échelle d'hydrophobicité globale.

Ceci a pu être confirmé en montrant que la Tt des ELPs dépend de leur séquence (nature du résidu X), de leur masse moléculaire et de leur concentration. Un résidu X apolaire (Ile, Leu, Phe ou Trp) augmente l'hydrophobicité globale du polypeptide, ce qui va diminuer la Tt. Inversement, la présence d'un résidu polaire (Ser, Lys, Asp) va augmenter la Tt. La force ionique de la solution dans laquelle les ELP sont dissous, ainsi que le pH (si présence de résidus X chargés), peuvent également influencer la Tt (Dreher *et al*. 2008).

5.2.1.2. Structure des ELPs.

La structure des ELPs dépend de la température de la solution dans laquelle ils sont dissous. Lorsque la température est en dessous de la Tt les ELPs n'ont pas de structure secondaire connue (« *random coil* »).

Lorsque la température augmente et dépasse la Tt, le polypeptide subit une séparation de phase, ce qui entraîne l'apparition d'une structure en spirale β (Figure 57) et la libération simultanée de molécules d'eau associées à la chaîne de polymère. La présence des prolines impose la formation de coudes β, avant qu'il y ait un arrangement des structures secondaires en spirales β.

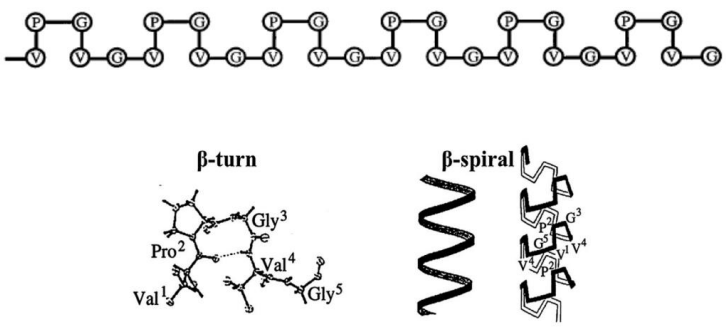


Figure 57 : Représentation du poly (VPGVG) adoptant une structure en spirale β à des températures supérieures à la Tt (Urry 1997).

Les répétitions VPGVG forment des β-tours, stabilisés par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Ces demi-tours s'ordonnent en spirales-β hélicoïdales.

5.3. Synthèse des ELPs.

La synthèse des ELPs se fait généralement par voie recombinante dans un hôte hétérologue, le plus souvent des bactéries ou des cellules eucaryotes. Les ELPs ainsi produits ont une séquence et une masse moléculaire parfaitement définie, à la différence des polymères synthétisés chimiquement. Les rendements de production sont relativement élevés (0,1 à 1 g/l culture), et leur purification se fait de manière simple, *via* des cycles de température inverse (ITC) sans qu'il soit nécessaire de recourir à des étapes coûteuses de chromatographie.

5.3.1. Synthèse des gènes d'ELPs.

Les ELPs peuvent être produits par voie recombinante dans différents hôtes, à partir d'un gène synthétique. Différents systèmes d'expression ont été utilisés pour synthétiser des ELPs : bactérie (Meyer *et al*. 2001), levures (Schipperus *et al*. 2009), plantes (Patel *et al*. 2007), champignons (Herzog *et al*. 1997; Schipperus *et al*. 2009), et systèmes d'expression acellulaire (Chu *et al*. 2010). Le système le plus utilisé reste la bactérie *Escherichia coli*, car les polypeptides obtenus ne nécessitent pas de modifications post-traductionnelles.

Les problèmes liés à la construction de souches productrices tiennent principalement à la nature hautement répétée des séquences codantes. En effet, même en jouant avec le code génétique et la fréquence d'utilisation des codons, un gène codant un $(VPGXG)_n$ contiendra un nombre important de répétitions. Cela signifie que les méthodes « modernes » de biologie moléculaire pour l'assemblage de gènes, qui reposent sur l'hybridation de séquences chevauchantes multiples par assemblage Gibson (Gibson *et al*. 2009) ou l'amplification de séquences par PCR, ne peuvent pas être utilisées. La synthèse des gènes d'ELP nécessitent donc l'utilisation de méthodes spécifiques basées sur l'utilisation d'enzymes de restriction de type IIS.

Deux des techniques les plus couramment utilisées pour la construction des gènes des ELPs sont la concaténérisation et la ligature directionnelle récursive.

5.3.2. Concaténérisation.

La concaténérisation est l'une des méthodes les plus anciennes de production d'une bibliothèque d'oligomères de différentes longueurs (Ben-Porat *et al*. 1976). Ce processus implique la ligature successive et simultanée de monomères d'ADN à extrémités cohésives à l'aide d'une ligase. Cette méthode est simple et rapide mais il n'est pas possible de bien contrôler le degré d'oligomérisation. Pour assembler des séquences plus longues ou créer des ELPs plus complexes codant pour des copolymères à blocs, Chilkoti et ses collègues ont donc développé une nouvelle stratégie de clonage, la ligature directionnelle récursive.

5.3.3. Ligature directionnelle récursive (RDL).

McDaniel et Chilkoti en 2010 (McDaniel *et al*. 2010) ont créé une méthode de clonage appelée PRe-RDL ou ligature directionnelle récursive par reconstruction plasmidique. Ce procédé lie deux segments d'un plasmide parent, chacun contenant une copie de l'oligomère souhaité, pour reconstituer un plasmide fonctionnel (Figure 58). L'étape de ligature utilise des endonucléases de restriction de type IIS, compatibles avec toute séquence oligonucléotidique. De plus, l'efficacité du clonage est améliorée puisqu'un plasmide fonctionnel n'est produit qu'après une ligature réussie.

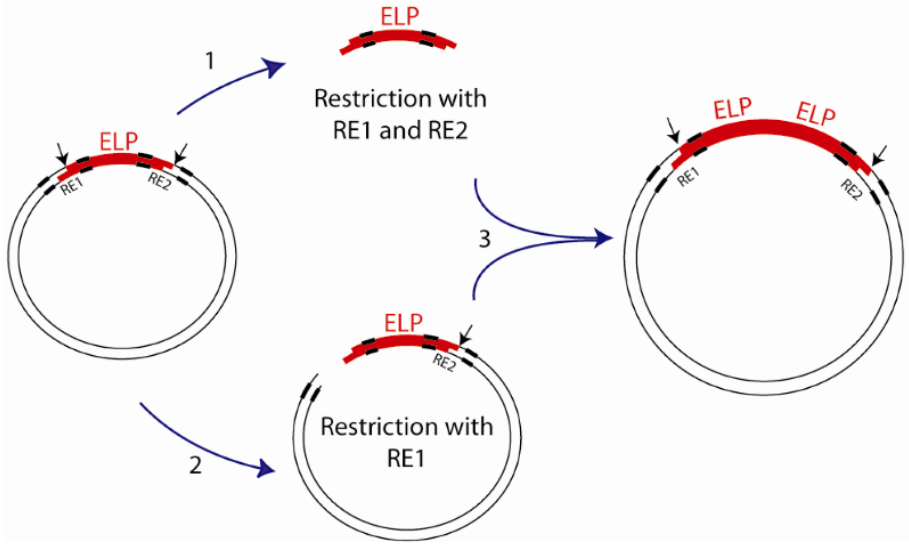


Figure 58 : Schéma de la méthode de Ligature Directionnelle Recursive (Dan E. Meyer et Chilkoti 2010).

Un gène sous forme monomérique (représenté en rouge) est inséré dans un vecteur de clonage. Ce gène contient deux sites de reconnaissance pour deux endonucléases de restriction différentes, RE1 et RE2, à chaque extrémité des séquences codantes. (**1**) Un insert est préparé par digestion du vecteur à la fois avec RE1 et RE2, puis ligaturé dans le vecteur qui a été linéarisé (**2**) par digestion avec seulement RE1. Le produit (**3**) contient deux répétitions en tête du gène original, les sites RE1 et RE2 sont maintenus uniquement aux extrémités du gène. Pour avoir des répétitions supplémentaires, des tours supplémentaires de RDL se font de la même manière, en utilisant les produits des tours précédents comme produits de départ.

Dans cette technique de PRe-RDL, deux parties aliquotes d'un plasmide sont utilisées comme substrats pour la réaction, elles sont digérées avec deux endonucléases de restriction de type IIS. Alors que les deux enzymes ont des séquences de reconnaissance différentes, les chevauchements qu'elles génèrent sont complémentaires. La ligature des deux moitiés du plasmide joint les deux sections des gènes de départ dans une orientation définie et sans ajouter de bases additionnelles. Le squelette plasmidique n'est reconstruit qu'après ligation, garantissant ainsi l'addition des deux séquences originales dans le gène final. Cette méthode est la méthode préférentielle pour assembler différents blocs d'ELPs, ainsi que pour ajouter des séquences codantes non-ELPs aux extrémités 5' et 3' des gènes.

5.4. Purification des ELPs par cycle de transition inverse (ITC).

Les ELPs, au même titre que les autres protéines recombinantes, peuvent être purifiés par des méthodes de chromatographies classiques, telles que la chromatographie par affinité. Dans ce cas, les ELP doivent être fusionnés avec par exemple une étiquette poly-histidine, qui permet de purifier le polypeptide de fusion par chromatographie Ni-NTA. Bien que la chromatographie par affinité puisse être utilisée pour la purification des ELP à l'échelle de laboratoire, il existe une technique beaucoup plus rapide : le cycle de transition inverse (ITC).

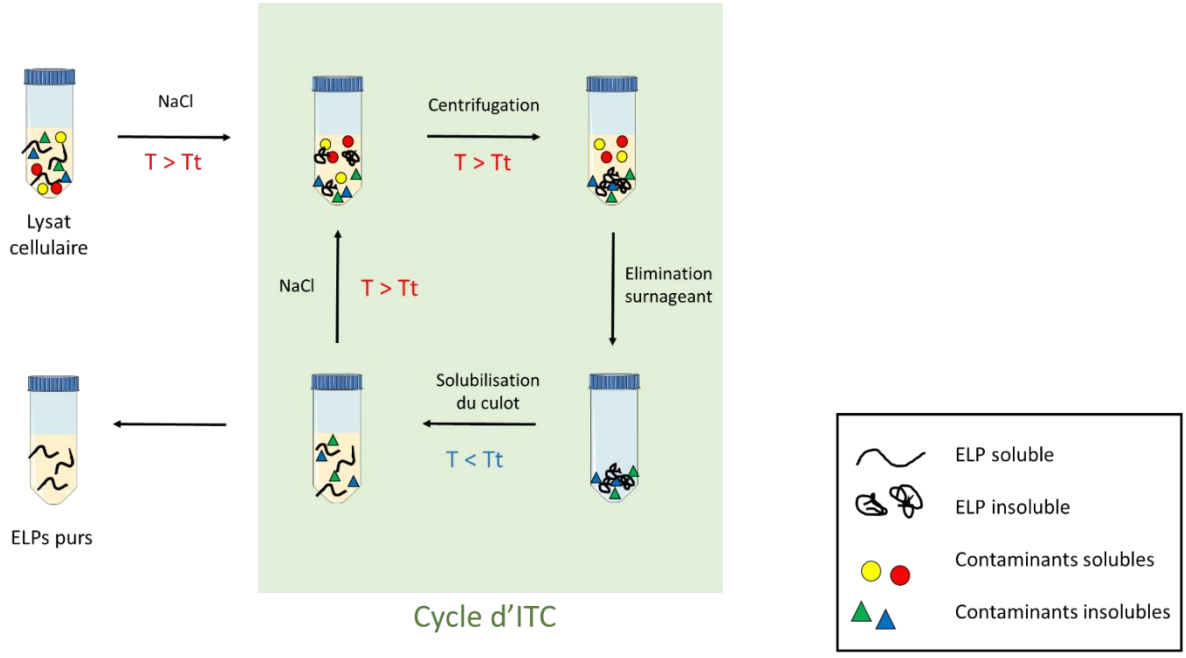


Figure 59 : Schéma représentant la méthode de purification des ELP par la technique d'ITC.
La thermosensibilité intrinsèque des ELPs est utilisée pour une purification non chromatographique simple par des cycles de refroidissement (les monomères d'ELPs sont alors solubles en solution et récupérés dans les surnageants) et chauffage (les ELPs vont alors coacerver et culoter).

L'ITC est une méthode de purification qui utilise la propriété de transition de phase inverse des ELPs. L'ITC offre de nombreux avantages techniques et économiques par rapport aux autres méthodes de

purification de protéines (Meyer & Chilkoti 1999). Au cours de l'ITC, les ELPs sont isolés du lysat de cellules bactériennes par une série de centrifugations à chaud (au-dessus de la Tt) et de centrifugations à froid (en-dessous de la Tt). Lorsqu'une centrifugation à froid est effectuée, les ELPs sont solubilisés et les impuretés insolubles peuvent être éliminées dans le culot. Le surnageant contenant les ELPs est ensuite chauffé au-dessus de la Tt et subit une centrifugation à chaud. Pendant la centrifugation à chaud, les ELPs se transforment en un agrégat insoluble, ce qui permet d'isoler les ELP des impuretés solubles qui restent dans le surnageant.

Après la centrifugation à chaud, le culot contenant les ELPs sera remis en suspension dans un tampon froid si des cycles supplémentaires d'ITC doivent être effectués, ou dans de l'eau si le processus d'ITC est terminé. Il faut généralement plusieurs cycles d'ITC pour purifier les ELPs à un niveau suffisant. Après la remise en suspension dans de l'eau désionisée, la solution d'ELPs est dialysée pendant 18 à 24 heures pour éliminer les sels et les agents réducteurs éventuellement présents.

5.5. Immunogénicité des ELPs.

Il existe une grande variété d'ELPs différents, le terme ELP est donc générique. Bien qu'étant composés de la séquence de base VPGXG, ils diffèrent dans leur longueur et dans les acides aminés présents à la position X. Par ailleurs des séquences supplémentaires sont parfois ajoutées comme des étiquettes pour la purification, des sites protéolytiques ou des séquences bioactives.

L'élastine naturelle, bien qu'étant très stable, peut dans certaines circonstances devenir pathologique. Elle est alors dégradée en peptides hautement immunogènes qui peuvent déclencher une réponse auto-immune dévastatrice, comme dans la sclérose systémique (Daskalova *et al*. 1997) ou la dissection de l'aorte thoracique chez les fumeurs (Gu *et al*. 2019). Ces pathologies se caractérisent par un taux plus élevé des enzymes dégradant l'élastine, les métalloprotéinases matricielles 9 et 12 ainsi que l'élastase neutrophile. L'élastase est exclusivement produite par le pancréas et catalyse l'hydrolyse de l'élastine par clivage les liaisons -Val-X-, -Ala-X-, -Leu-X-, et Met-X (Esteghamat *et al*. 2019).

Antibody	Ala-Lys sequences	Hydrophobic and other sequences
mAb A2.1	AAAAYKAAK [74–80, exon 6]	
mAb G8.1		AAGLGAGIPG [547–554, exon 26]
mAb A7.1		GLGAGLGA [49–54, exon 5]
pAb κE(L)	AAKAAQFGL [670–676, exon 29]	LGGVPGVG [87–92, exon 7] GVVGAGPA [654–659, exons 28–29] GLGGLGVGG [683–689, exon 30] GVPGVGGLGG [693–700, exon 30]
	PAAAAKAAKYGAAG [705–716, exons 31–32]	AAGLGGVLGGAGQFPLGGVAARPGFGLSP [716–742, exons 32–33] GGACLGKACG [748–755, exon 36]
pAb κE(S)	AAAKAAAK [464–469, exon 23] AAKYGAAV [629–634, exons 27–28]	GAFPAVTF [55–60, exon 6] PGVGLAPG [497–502, exon 24]
	AAAKAAAK [655–670, exon 29]	ACLGKACG [750–755, exon 36]
pAb L85%	AAKAQLRA [539–544, exon 25]	VGLAPGVG [499–504, exon 24] PSSSQHLP [605–610, exon 26A] GVGIPGGVVGAGPA [648–659, exons 28–29]
	AKAAQFGL [671–676, exon 29]	LGGLGVGG [684–689, exon 30] PGVGGLGGI [695–701, exon 30] GGACLGKACG [748–755, exon 36]
pAb TE	VADAAAAYK [71–77, exon 6]	AVTFPGAL [59–64, exon 6] GAGLGGVP [84–89, exon 7] VGGLGVSA [93–98, exon 7] AAGLGGLG [681–686, exon 30] AAGLGGVL [716–721, exon 32] GQFPLGGVA [727–733, exons 32–33] SPIFPGGA [743–748, exon 33]

Tableau 3 : Séquences de la tropoélastine humaine qui réagissent avec les anticorps (Wei *et al*. 1998).

Les séquences reconnues sont soulignées : 24 séquences hydrophobes, et 9 séquences riches en Alanine et Lysine (hydrophiles) qui sont généralement situées dans les zones de réticulation de l'élastine mature. La position de la séquence dans la molécule de tropoélastine est indiquée entre parenthèses.

Wei et collaborateurs (Wei *et al*. 1998) ont identifié les épitopes potentiellement immunogènes de la tropoélastine humaine (Tableau 3). Des tests immunologiques ont été réalisés après que les fragments de la protéine hydrolysée aient été injectés à des lapins et des souris pour obtenir respectivement des anticorps polyclonaux et monoclonaux. Les épitopes les plus fréquemment reconnus sont des séquences hydrophobes. Ces mêmes anticorps n'ont pas permis la reconnaissance de l'élastine mature réticulée (Starcher *et al*. 1999). Par ailleurs, l'un des motifs pentapeptidiques les plus utilisés dans les ELPs est la séquence VPGVG, elle fait partie des peptides qui induisent une réponse immunitaire. Il est intéressant de noter que lorsque de petits peptides (GVGVP, VPGVG, VPGG) ont été utilisés en compétition des séquences de la tropoélastine dans un test ELISA, ils ne sont pas rentrés en compétition et n'ont pas empêché la liaison des anticorps. Ces résultats suggèrent que seuls des peptides plus longs contenant ces motifs, tels que LGGVPGVG ou VPGVGGLG par exemple, pourraient être immunogènes.

L'ensemble de ces résultats montrent que les formes agrégées d'ELPs, qu'elles soient sous forme de coacervats ou réticulées, sont moins immunogènes que les formes monomériques solubles.

5.6. Modifications chimiosélectives des acides aminés des ELPs.

Les modifications post-traductionnelles (PTM) des protéines (Soffer 1973), impliquent des modifications chimiques covalentes réalisées par des enzymes pendant ou après la synthèse des protéines. On peut avoir ajout ou élimination d'acides aminés ou de peptides, de sucres par glycosylation (Grebner *et al*. 1966; Roberts 1960; Spiro *et al*. 1971), de lipides par acylation (Bizzozero & Lees 1986; Griffin & Reese 1964) ou myristoylation (Aderem 1988; Shoji & Kubota 1989), ou bien des modifications chimiques telles que les phosphorylations, les oxydations (Fiala 1947), les acétylations (Miller & Great 1972; Saxholm *et al*. 1982) et les méthylations (Comb *et al*. 1966; Paik & Kim 1971; Paik & Kim 1969). Les PTM jouent un rôle crucial dans presque tous les processus cellulaires, notamment le cycle cellulaire, la dégradation des protéines, l'apoptose, la signalisation cellulaire et la transcription.

Ces PTM vont induire des modifications de la fonction de la protéine, que ce soit au niveau de son action, de sa demi-vie (qui peut être allongée ou diminuée), ou de sa localisation cellulaire (Müller 2018). Afin d'introduire des fonctionnalités supplémentaires, les ELPs peuvent être modifiés de manière chimiosélective au niveau d'un acide aminé d'intérêt. Ces modifications font partie de la « chimie clic », ou *click chemistry*, qui désigne un ensemble de réactions qui ont l'avantage d'être rapides, simples d'utilisation, fonctionnant dans des solvants aqueux, permettant d'obtenir des rendements de réaction élevés, et qui sont surtout région spécifiques (Hein *et al*. 2008).

Parmi les vingt acides aminés constitutifs des protéines, cinq résidus ont sur leur chaîne latérale des groupes fonctionnels qui peuvent être utilisés pour des modifications post-traductionnelles sélectives : la cystéine, la lysine, la tyrosine, le tryptophane et la méthionine. Les extrémités N-terminales sont composées d'une fonction amine libre (-NH2) au même titre que la lysine, et elles peuvent donc être également modifiées. L'extrémité C-terminale protéique est caractérisée par une fonction carboxyle portée par le dernier acide aminé de la chaîne polypeptidique ; aucune donnée de la littérature ne montre de modification chimique particulière de cette extrémité.

5.6.1. Modification de l'extrémité N-terminale et de la lysine.

L'extrémité N-terminale et l'acide aminé lysine sont tous deux composés d'une amine libre. Elles peuvent être modifiées en synthèse organique par des aldéhydes, des esters de N-hydroxysuccinimide, des chlorures de sulfonyle, des isothiocyanates et des acrylates de sulfonyle (Spicer & Davis 2014). Le pKa du groupe ammonium de l'extrémité N-terminale est de 9,21 pour les protéines recombinantes contenant une méthionine, et le pka de la chaîne latérale de la lysine est de 10,53. Il est donc assez difficile de « chimiosélectivement » modifier l'extrémité N-terminale dans une protéine contenant des lysines. Pourtant, si la sélectivité du site de modification n'est pas primordiale, ou lorsque des

conjugaisons multiples sont souhaitées, elles peuvent être modifiées. Smith et collaborateurs (Smith *et al*. 2006) ont utilisé une lysine réactive à l'extrémité N-terminale pour greffer plusieurs antigènes à la surface d'un virion pour des applications en vaccinologie.

5.6.2. Modification de la chaîne latérale d'un acide aminé dans la séquence.

5.6.2.1. La cystéine.

La cystéine est l'acide aminé qui a été le plus étudié dans les stratégies de modification, comparativement aux autres résidus. Il s'agit d'un acide aminé naturel peu abondant dans les protéines (1-3 %) (Lopez & Mohiuddin 2022). Il est très nucléophile, dû à sa fonction thiol (-SH), et permet des modifications sélectives de site. Les modifications les plus importantes des cystéines sont la phosphorylation, l'oxydation et la polyprénylation (Chalker *et al*. 2009).

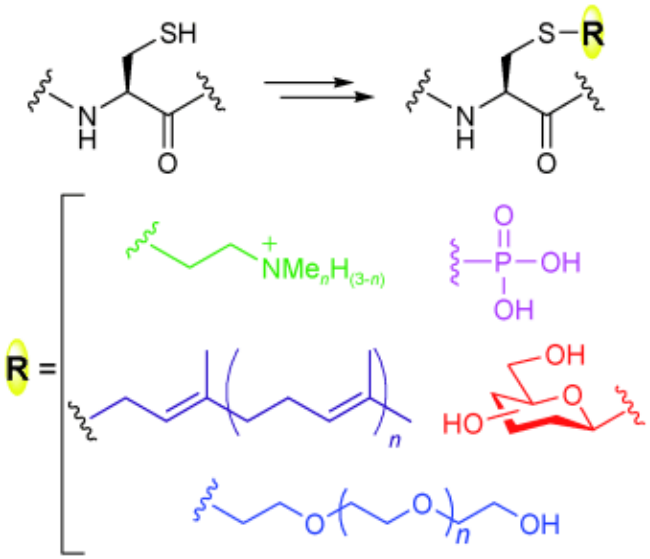


Figure 60 : Modifications post-traductionnelles possibles sur l'acide aminé cystéine (Chalker *et al*. 2009).

La cystéine peut être modifiée au niveau de son atome de soufre de sa chaîne latérale par méthylation (**vert**), phosphorylation (**violet**), polyprénylation (**bleu marine**), glycosylation (**rouge**) ou ajout de méthoxy polyéthylène glycol (**bleu**).

L'oxydation des thiols en disulfure a été exploitée pour la réticulation des ELPs (Xu *et al*. 2012). Dans cette étude, des ELPs contenant des cystéines ont été réticulés afin de former des hydrogels à l'aide de peroxyde d'hydrogène. Le taux de réticulation a pu être facilement modulé en faisant varier la concentration en H_2O_2. Toutefois, les auteurs n'ont pas réussi à obtenir un taux de réticulation de 100 %.

5.6.2.2. Le tryptophane et la tyrosine.

Le tryptophane et la tyrosine sont deux acides aminés comportant au moins un cycle aromatique. Le tryptophane est l'acide aminé le plus rare, il compose uniquement 1,3 % des protéines. Le

tryptophane possède un hétérocycle indole. Les tryptophanes peuvent être modifiés *in vivo* par des sucres, des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, ainsi que par des groupes hydroxyle (Hofsteenge *et al*. 1994; Yamakura & Ikeda 2006; Zheng *et al*. 2015). Leurs modifications utilisent des métallocarbénoïdes (Antos & Francis 2004), mais aucune de ces modifications n'a été rapportée pour les ELPs.

La chaîne latérale de la tyrosine est composée d'un groupe phénol. Les modifications des tyrosines ont permis l'administration de médicaments (radionucléide) pour la radiothérapie locale du cancer (Liu *et al*. 2010). Seifried et collaborateurs (Seifried *et al*. 2018) ont pu former des glycoprotéines en greffant des oligosaccharides sur des ELPs enrichis en tyrosine.

5.6.2.3. La méthionine.

La méthionine est un acide aminé essentiel à la synthèse des protéines. C'est l'acide aminé N-terminal de toutes les protéines bactériennes et de la plupart des protéines eucaryotes. Elle est peu abondante naturellement. La méthionine possède un groupe thioéther au niveau de sa chaîne latérale, et ses PTM naturelles sont l'oxydation du thioéther en sulfoxyde ou en sulfone et l'adénosylation.

En 2015, notre groupe du LCPO a commencé à explorer les modifications « chimiosélectives » des ELPs au niveau des résidus méthionine comme un moyen de moduler leurs propriétés thermosensibles et d'introduire diverses fonctionnalités (Kramer *et al*. 2015). Dans des conditions physiologiques, le résidu méthionine est peu nucléophile, ce qui explique que ses modifications restent moins explorées que celles visant la lysine et la cystéine. Toutefois, en conditions acides, il est possible d'alkyler le groupe thioéther de la méthionine, et cela à faible pH sans nécessité de groupe protecteur pour les autres résidus de la chaîne peptidique. Deming et ses collaborateurs (Deming 2017) ont mis au point une méthode plus polyvalente basée sur l'utilisation de dérivés époxydes qui a considérablement élargi le champ des modifications de la méthionine.

L'inconvénient majeur des stratégies utilisant des époxydes est la formation de groupes sulfonium (Figure 61). Ces groupes vont induire la perte de la thermosensibilité de la protéine ELP. Pour pallier ce problème, des stratégies ont été mises en place par Rosselin et collaborateurs (Rosselin *et al*. 2019) pour éliminer le groupe méthyle.

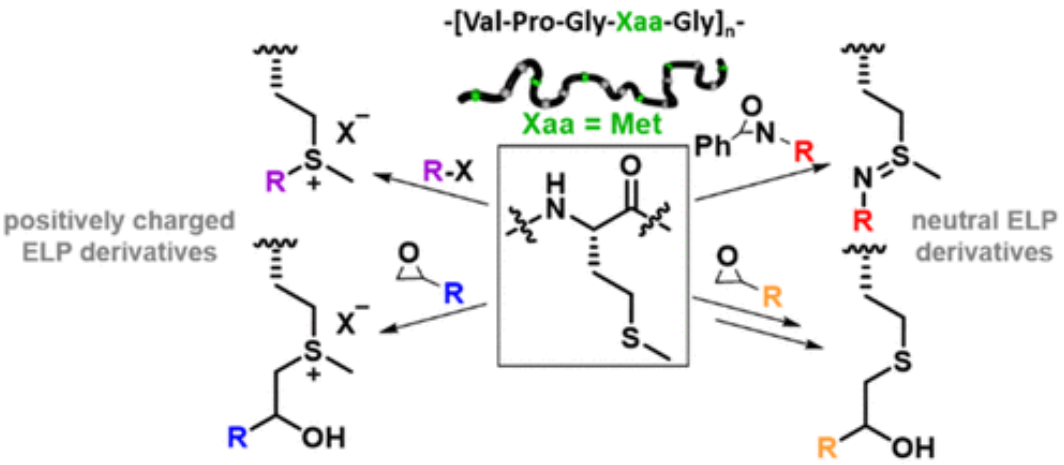


Figure 61 : Modifications chimiosélectives possibles sur les résidus méthionines du VPGMG (Rosselin *et al*. 2019).

L'ELP M40 contenant 11 résidus de méthionine (vert) a été chimiosélectivement modifié pour introduire des groupes fonctionnels à l'aide de différentes stratégies. Deux alkylations ont été réalisées à l'aide d'halogénure d'alkyle (violet) ou d'époxyde (bleu) et donnent des groupes sulfonium qui sont chargés positivement. La méthode ReACT (rouge et orange) ne modifient pas la charge des ELPs.

Par ailleurs, une autre stratégie appelée *Redox-Activated Chemical Tagging* (ReACT) développée par Lin et collaborateurs (Lin *et al*. 2017), permet d'obtenir des dérivés sulfimides non chargés sur les résidus méthionines des ELPs par imidation. Dans cette méthode, des dérivés d'oxazidine servent de réactifs à médiation oxydante. Ils permettent le greffage de composés d'intérêts avec des temps de réaction inférieurs à une heure. Au cours de ce processus redox, les réactifs oxazidine oxydés sont réduits en benzaldéhyde avant d'être éliminés.

5.7. Les ELPs en ingénierie tissulaire.

La majorité des travaux antérieurs sur la création de matériaux pour la régénération tissulaire utilisaient soit des polymères synthétiques biomimétiques soit des protéines issues de la MEC naturelle ayant subi par exemple des traitements de décellularisation (voir paragraphe III. « Substituts osseux »). Les ELPs possèdent des avantages majeurs pour des applications en médecine réparatrice, car ce sont des polypeptides issus de l'élastine humaine qui ont la capacité de s'auto-assembler par des interactions hydrophobes dès que la température est supérieure à leur Tt.

Les ELPs sont intéressants pour les applications d'ingénierie tissulaire car leurs propriétés physiques peuvent être contrôlées avec précision. Il est possible d'agir au niveau de la séquence codante, permettant ainsi le contrôle de la masse moléculaire du polypeptide. Il est également possible de faire varier le degré de réticulation en jouant sur le nombre et la position des sites de réticulation possibles (Lee *et al*. 2001). La dernière stratégie consiste à modifier des acides aminés à des positions précises pour pouvoir y greffer des molécules d'intérêt (Rosselin *et al*. 2019). Les paragraphes suivants décrivent quelques applications des ELPs en ingénierie tissulaire.

5.7.1. Les ELPs pour la réparation du cartilage.

Le cartilage articulaire est avasculaire, alymphatique et aneural (Buckwalter & Mankin 1998). Lorsque le cartilage est abîmé il ne peut pas se réparer, ce qui en fait un candidat cible des stratégies de réparation en ingénierie tissulaire.

Nettles et collaborateurs (Nettles *et al*. 2008) ont développé un hydrogel d'ELP à la fois injectable et réticulable *in situ* pour une réparation de la matrice cartilagineuse dans des défauts de taille critique localisés dans des condyles de chèvre. Cet hydrogel est composé d'un ELP de 93,4 kDa contenant des lysines à la position X qui sont chimiquement réticulées avec un agent réactif aux amines, l'acide β-[Tris(hydroxyméthyl)phosphino] propionique [bétaïne] (THPP). Un défaut condylaire chez la chèvre a été réalisé (Figure 63). Ce défaut a été laissé vide ou a été comblé avec un hydrogel d'ELPs. Trois mois après implantation, le défaut comblé avec l'hydrogel d'ELPs a montré une meilleure intégration du biomatériau et une diminution du diamètre du défaut (Figure 62F et H).

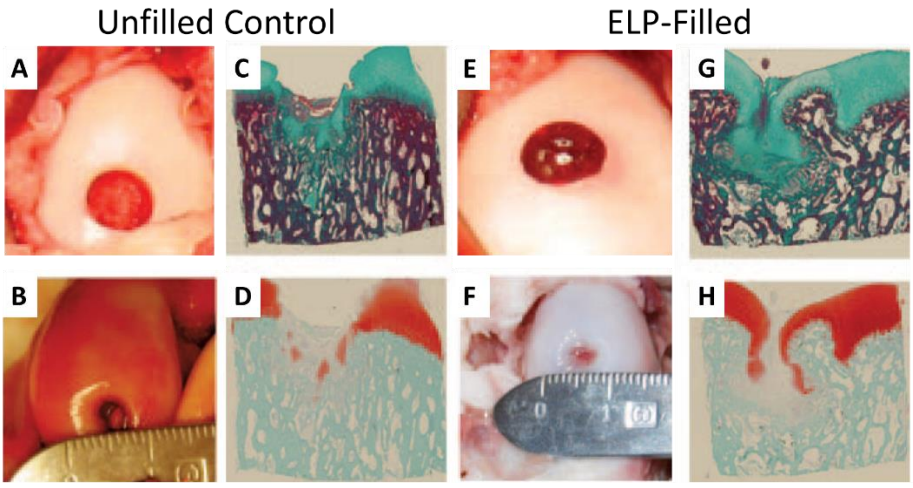


Figure 62 : Défauts ostéochondraux dans des condyles fémoraux de chèvres vides ou comblés avec un hydrogel ELPs, et analyse histologiques (Nettles *et al*. 2008).

Des défauts ostéochondraux circulaires de 6 mm de diamètre et 4 mm de profondeur ont été réalisés sur des condyles de chèvres femelles. Les défauts au temps zéro laissés vides (**A**) et comblés avec un hydrogel d'ELP (**E**) sont représentés. 3 mois après la chirurgie, les défauts vides (**B**) et remplis d'ELP (**F**) sont représentés. Des coupes histologiques ont été réalisées 3 mois après implantation et ont été colorées au trichrome de Masson (**vert**, **C** et **G**) et à la Safranin-O (**rouge**, **D** et **H**).

D'autres travaux ont utilisé des hydrogels d'ELPs pour la régénération du cartilage. Ces matériaux possèdent des propriétés mécaniques, une malléabilité et une biocompatibilité adaptées, mais ils ne présentaient que de faibles résultats en termes de réparation. Ces matériaux ne possédaient pas la capacité d'attirer les cellules à la fois au niveau du défaut et à l'intérieur du matériau. Cette faible pénétration des cellules dans l'hydrogel était probablement due à un réseau trop dense et/ou à un matériau peu poreux. Ces matériaux ont été ensuite améliorés en ajoutant des cellules dans l'hydrogel avant implantation (Cipriani *et al*. 2019; Pescador *et al*. 2017), ou en ajoutant d'autres éléments

protéiques telle que la soie (Chen *et al*. 2021), ou encore des polymères de sucres comme l'acide hyaluronique (Shirzaei Sani *et al*. 2018; Zhu *et al*. 2017).

5.7.2. Les ELPs en ingénierie tissulaire oculaire.

Des hydrogels d'ELPs ont été élaborés en présence de cellules épithéliales (Martínez-Osorio *et al*. 2009) pour des applications d'ingénierie tissulaire oculaire. Les cellules ont montré une bonne adhésion et une bonne prolifération au sein du biomatériau. George et collaborateurs (George *et al*. 2016) ont montré que les ELPs fusionnés à des peptides de pénétration cellulaire (ou *CPP*) appliqués par voie topique peuvent pénétrer la barrière cornéenne. Cette étude a de plus montré que les ELPs seuls peuvent pénétrer l'épithélium cornéen et s'accumuler dans le stroma, et que le CPP ne permet pas une meilleure pénétration. Ces ELPs ont également le potentiel de servir de vecteur de médicaments pour des applications oculaires topiques.

5.7.3. Les ELPs pour les greffes vasculaires.

Les propriétés mécaniques des ELPs en ont fait un composé utile au développement des greffons vasculaires. La majorité des substituts vasculaires développés ont associé les ELPs aux fibres collagéniques (Camasão *et al*. 2020; Caves *et al*. 2010). Dans les conditions physiologiques, les vaisseaux sanguins possèdent trois couches distinctes qui sont l'adventice, la media et la tunique intima. Cette dernière est composée d'une lame basale soutenue par une fine couche d'élastine appelée lame élastique interne. L'une des avancées majeures a été développée par l'équipe de Gonzalez-Perez. Ils ont utilisé une technique de moulage des ELPs pour produire des substituts de la tunique adventicielle et de la lame élastique de la paroi vasculaire. Pour ce faire, à l'aide d'un insert central qui formera le futur lumen, ils ont utilisé la capacité des cellules vasculaires à produire leur propre MEC. Ils ont obtenu 4 substituts vasculaires différents à base d'ELPs seuls, de Collagène I seul, d'un mélange de 50 % ELP et 50 % Collagène, et finalement d'un mélange 70 % de collagène et 30 % d'ELP.

Les différents substituts vasculaires ont été obtenus après 3, 7 et 14 jours de culture (Figure 63). Les substituts à base de collagène seul ont montré de faibles propriétés mécaniques, alors que ceux obtenus par les ELPs seuls ont permis la formation de tubes, montrant que ces polypeptides permettent d'obtenir des structures organisées.

L'association d'ELPs avec le collagène a permis d'obtenir des greffons double couche de diamètre interne d'environ 2 mm dès 3 jours de culture. Cette stratégie associant ELPs et collagène semble donc prometteuse pour le développement de greffons vasculaires.

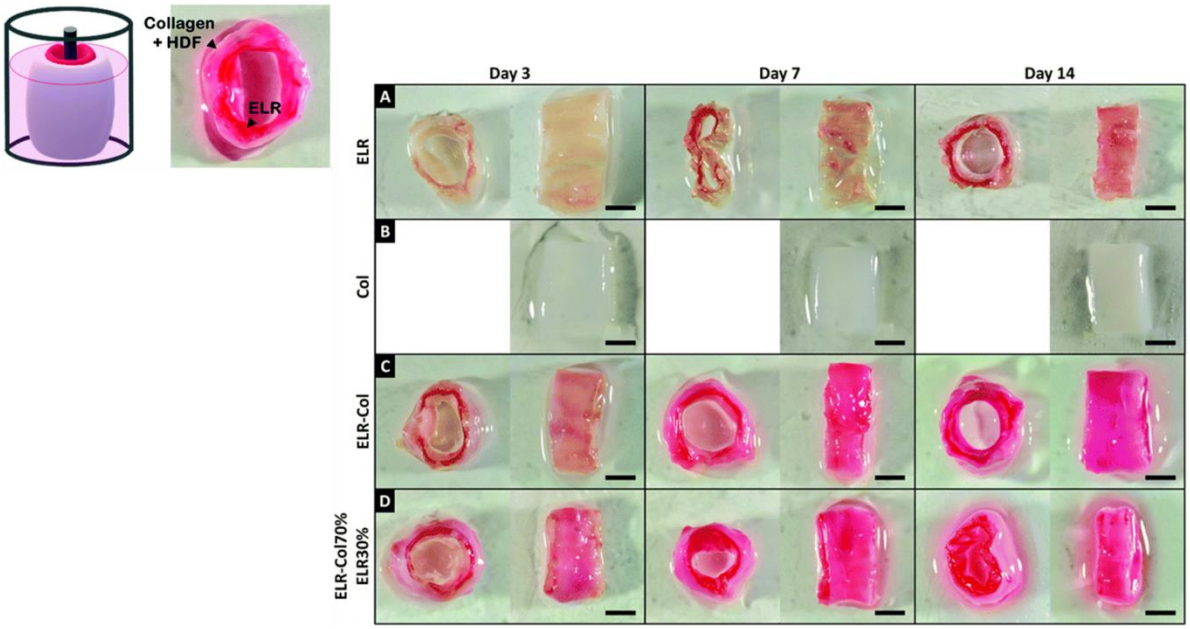


Figure 63 : Représentation macroscopique de modèles mono- et bi-couches contenant du collagène I et/ou des ELPs (ELR) obtenus par moulage (González-Pérez *et al*. 2021).

Des biomatériaux à base de collagène ou d'ELPs ont été obtenus par la technique de moulage à l'aide d'un ou deux moules tubulaires. Les vues de côté et du dessus des modèles (**A**) ELR seul, (**B**) collagène I seul (ce biomatériau ne tient pas verticalement), (**C**) ELR-Col et (**D**) ELR-Col70%ELR30%. Les jours 3, 7 et 14 sont présentées dans chaque colonne. Pour les modèles bicouches (**C** et **D**), le tube orange à rouge affiché à l'intérieur correspond à la couche ELR, tandis que le tube blanc qui l'entoure correspond à la couche de collagène. Barre d'échelle : 2 mm.

5.7.4. Les ELPs en ingénierie tissulaire osseuse.

De nombreux matériaux ont été développés à partir d'ELPs pour la régénération osseuse (Tableau 4). De manière générale, ces matériaux sont soit sous forme d'hydrogels chimiquement liés avec des agents de réticulation, soit constitués de nanoparticules qui s'autoassemblent dès que la température dépasse la Tt des ELPs en question.

Les produits développés sont tous composites. Ils sont associés à d'autres protéines, essentiellement du collagène de type I (Amruthwar & Janorkar 2013; Gurumurthy *et al*. 2020; Gurumurthy *et al*. 2016; Pal *et al*. 2019; Wheeler *et al*. 2013), ou bien de la fibronectine (Lee *et al*. 2019). Pour apporter des propriétés ostéoconductrices, les matériaux sont alors associés à des céramiques à base de phosphate de calcium comme l'hydroxyapatite (Tejeda-Montes *et al*. 2014; Vila *et al*. 2016; Wang *et al*. 2011), le bioverre (Gurumurthy *et al*. 2020; Wheeler *et al*. 2013) ou à des phosphates de calcium amorphes (Li *et al*. 2017). Le recouvrement de métaux avec des ELPs adsorbés a également été étudié (González *et al*. 2013).

Tableau 4 : Études utilisant des ELPs pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

La séquence correspondant au domaine pentapeptidique des ELPs est représentée en gris, les autres motifs peptidiques sont représentés en rose, les séquences n'ayant pas d'activité connue ne sont pas soulignées. Les expérimentations *in vitro* et *in vivo* sont indiquées.

Auteur (année)	Séquence ELP	Matériel composite (polymères et céramiques supplémentaires)	Séquence bioactive	Agent de réticulation utilisé	Type de matériau	Étude *in vitro*	Étude *in vivo*
(Wang et al., 2011)	• MSGVG[VPGVG]$_{125}$VPG • MSGVG[VPGVG]$_{25}$VPGSEEEEEEEEE • MSEEEEEEEEGPG[VPGVG]$_{125}$VPGSEEEEEEEEE • MSGVG[[VPGVG]$_2$VPGKG[VPGVG]$_2$]$_{25}$VPG • MSGVG[[VPGVG]$_2$VPGEG[VPGVG]$_2$]$_{25}$VPG ▪ [[(VPGIG)$_2$[VPGKG](VPGIG)$_2$]$_2$DDDEEKFLRRIGR FG(VPGIG)$_2$VPGKG(VPGIG)$_2$]$_{13}$ ▪ [[(VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_2$DDDEEKFLRRIGR FG(VPGIG)$_2$VPGKG(VPGIG)$_2$]$_{13}$-[(VPAVG)]$_{20}$	nHAP Tetracalcium phosphate (TTCP) Dicalcium phosphate anhydre (DCPA)		Acide octaglutamique	Matrice composite		
(Prieto et al., 2011)	▪ [[(VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_2$DDDEEKFLRRIGR FG(VPGIG)$_2$VPGKG(VPGIG)$_2$]$_{13}$-[(VPAVG)]$_{20}$ [(VPAVG)]$_{20}$[((VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_2$DDDE EKFLRRIGRFG((VPGIG)$_2$VPGKG(VPGIG)$_2$]$_{13}$		SNA 15		Additif de cristallisation pour le phosphate de calcium	Minéralisation dans un fluide corporel simulé (SBF)	
(Li et al., 2017)	• ((VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_{24}$V • ((VPGVG)$_2$(VPGKG)(VPGVG)$_2$]$_{24}$V • [(VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$EEIQIGHIPREDVDYH LYP(VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$(VGVAPG)$_3$]$_{10}$V • [((VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_2$DDDEEKFLRRIGR FG((VPGIG)$_2$VPGKG(VPGIG)$_2$]$_{13}$V	Phosphates de calcium amorphes stabilisés avec polyaspartate		Diisocyanate d'hexaméthylène	Autoassemblage de nanofibrilles		
(Wheeler et al., 2013)	• [((VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_2$DDDEEKFLRRIGR FG((VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_{13}$(VPAVG)$_{20}$[((V PGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_2$DDDEEKFLRRIGRFG((VPGIG)$_2$(VPGKG)(VPGIG)$_2$]$_{13}$-V	Bioverre 45S5 Chaînes de nanosphères de carbone (CNSC)					
(Amruthwar and Janorkar, 2013)	MVSACRGPG-[VPGVG]$_{120}$-WP	Collagène				Croissance et expression des ostéoblastes	
(McCarthy et al., 2016)	MVSACRGPG-[VPGVG]$_{120}$-WP	Collagène Fusion ELP-BMP2			Nanoparticules autoassemblées	Différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses	

(Pal et al., 2019)	MVSACRGPG-$[VPGVG]_{120}$-WP	Collagène	BMP2 Doxycycline	N-hydroxysuccinimide (NHS) et 1-Ethyl-3 -(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC)	Hydrogels	la prolifération des cellules souches dérivées du tissu adipeux humain	
(Lee et al., 2019)	$(VPGXG)_{30}$ avec en X : $V_{17}L_4G_9$	Fusion ELP- domaine III de la fibronectine				Adhésion, prolifération et différenciation osteogénique de hMSCs	
(Gurumurthy et al., 2016)	MVSACRGPG-$[VPGVG]_{120}$-WP	Collagène			Hydrogel	Différenciation des cellules souches humaines adipeuses	
(González et al., 2013)	Séquence exacte non indiquée, contient : 6 motifs RGD, 6 acides aspartiques (D), 24 lysines (K) et 7 histidines (H)	Alliages de titane de type β	RGD		Recouvrement d'ELP sur matériau titane	Prolifération de MG63 humaines (cellules osseuses d'ostéosarcomes)	
(Vila et al., 2016) **(Hrabchak et al., 2010)**	• MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMESLLP$[[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2$AVTGRGDSPASS$[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2]_6$V • MESLLP$[[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2$DDDEEKFLRRIGRFG$[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2][[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2$AVTGRGDSPASS$[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2]_4$V	HA substitué en strontium (Si-HA)	RGD RGD/SNA15	Méthacrylamide (MMA) et N,N′-méthylène-bis-(acrylsaeuramide) (MBAA)	Matrice	Viabilité, prolifération et différenciation de de rBMSC	
(Tejeda-Montes et al., 2014)	• $(VPGIG\ VPGKG\ VPGIG\ VPGIG)_{24}$ • $[[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2$AVTGRGDSPASS$[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2]_6$ • $[[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2$DDDEEKFLRRIGRFG$[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2]_3$ • $[[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2$DDDEEKFLRRIGRFG$[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2]_4$ $[[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2$AVTGRGDSPASS $[(VPGIG)_2\ (VPGKG)\ (VPGIG)_2]_2]_4$	HAP	RGD	Génipine	Membrane	Différenciation ostéoblastique de rMSC	Défaut ostéochondral (genou de lapin) Défaut osseux de calvaria de rat
Coletta et al., 2017)			RGD BMP2		Hydrogel		Lésion osseuse fémur de lapin
(Gurumurthy et al., 2020)	MVSACRGPG-$[VPGVG]_{120}$-WP	Collagène Bioverre	Domaines de reconnaissance de l'élastase			Différenciation ostéoblastique de rMSC	Sous cutané Défaut osseux de calvaria

D'autres stratégies ajoutent des facteurs de croissance aux ELPs, en particulier la BMP2 (Coletta *et al*. 2017; McCarthy *et al*. 2016; Pal *et al*. 2019), ce qui favorise la formation de tissu osseux dans des situations pathologiques comme la dégradation osseuse liée à une dépendance alcoolique (dos S Kotake *et al*. 2015). Des séquences peptidiques supplémentaires peuvent être ajoutées pour apporter l'adhésion cellulaire, comme le motif RGD (Coletta *et al*. 2017; González *et al*. 2013; Tejeda-Montes *et al*. 2014; Vila *et al*. 2016), ou le motif SNA15 qui permet de nucléer le phosphate de calcium (Prieto *et al*. 2011; Vila *et al*. 2016). L'intérêt de ces motifs a été discuté plus en détail dans le paragraphe IV. L'ensemble de ces travaux montrent que les ELPs seuls ne permettent pas une régénération osseuse, mais que leur association à d'autres molécules ou matériaux en font un choix particulièrement intéressant, notamment en raison de leur propriété élastique qui donne des propriétés intéressantes aux hydrogels (González *et al*. 2013; Pal *et al*. 2019), allant jusqu'à la possibilité de pouvoir les imprimer par des techniques de bio-impression (Dai, Belaïdi, *et al*. 2021).

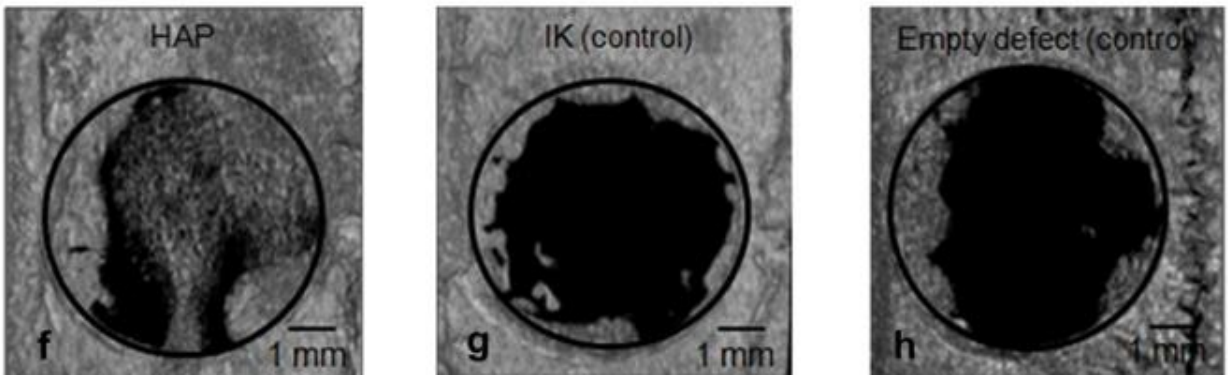


Figure 64 : Membranes à base d'ELPs implantées dans des défauts de calvaria (Tejeda-Montes *et al*. 2014).

Des défauts de 5 mm de diamètre ont été réalisés dans des calvarias de rat, puis des analyses micro-CT ont été réalisées 7 jours après implantation. Les défauts ont été laissés vide ou comblés avec des membranes. La membrane IK est composée d'ELPs seuls de séquence $(VPGIG\ VPGKG\ VPGIG\ VPGIG)_{24}$. La membrane HAP correspond à une matrice composée d'ELP de séquence $[[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2$DDDEEKFLRRIGRFG$[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2]_3$ et de particules d'hydroxyapatite (la séquence soulignée correspond à une séquence de nucléation du CaP).

Enfin, Tejeda et collaborateurs (Tejeda-Montes *et al*. 2014) ont utilisé des ELPs pour développer des membranes pour la réparation osseuse (Figure 64). Celles-ci sont composées d'ELPs à base de VPGIG et VPGKG avec l'acide aminé lysine (K) qui sert de point de réticulation. Ces membranes contiennent également des motifs peptidiques RGDS pour favoriser l'adhésion des cellules souches mésenchymateuses et le peptide DDDEEKFLRRIGRFG pour la nucléation des particules d'HA. Le suivi en micro tomographie aux rayons X a montré que des membranes composées uniquement d'ELP implantées dans des défauts de calvaria n'améliorent pas la réparation osseuse, comparativement au défaut non comblé. Les résultats avec la membrane supplémentée en HAP ont quant à eux montré une régénération significativement améliorée, en périphérie et à l'intérieur du défaut. Ces données suggèrent que les matériaux composites contenant des ELPs peuvent fournir un environnement favorable à la réparation osseuse.

Objectifs de la Thèse

Dans le contexte expérimental et clinique précédemment présenté, au vu des données physiologiques sur la composition du tissu osseux, sa vascularisation, la présence de structures nerveuses, et des échecs rencontrés par de nombreux substituts osseux, l'objectif de cette thèse a été de développer un nouveau biomatériau, de type matrice composite, qui offre un microenvironnement favorable à la formation osseuse, l'angiogenèse et la neurogenèse.

Notre choix s'est porté sur une matrice composite formée par des « Elastin-like polypeptides » (ELPs), qui dans notre cas sont des polymères recombinants de séquence [Val-Pro-Gly-**Met**/$Val_{(1/3)}$-Gly]$_n$, modifiés par des peptides d'ancrage des cellules endothéliales et des neurones sensoriels, et produits par la bactérie *Escherichia coli*. Nous avons opté pour une stratégie visant à modifier « chimiosélectivement » les résidus de méthionines afin de greffer des peptides connus pour leur rôle dans l'interaction avec les cellules endothéliales et les neurones sensoriels. Cette stratégie est plus versatile que celle précédemment utilisée dans notre équipe, qui consistait à insérer les peptides d'intérêt dans la séquence de l'ELP (Paiva dos Santos *et al*. 2019), puisqu'elle permet à partir d'un ELP initial de faire varier la nature des peptides greffés, ainsi que leur concentration sans avoir à recourir aux étapes fastidieuses d'obtention des clones bactériens.

Le premier objectif de ces travaux de thèse a été de produire plusieurs ELPs de longueurs variables nommés ELP M40, M60, M80 et M100 contenant des méthionines (M) (le nombre associé correspond au nombre de répétitions du motif pentapeptidique de l'ELP).

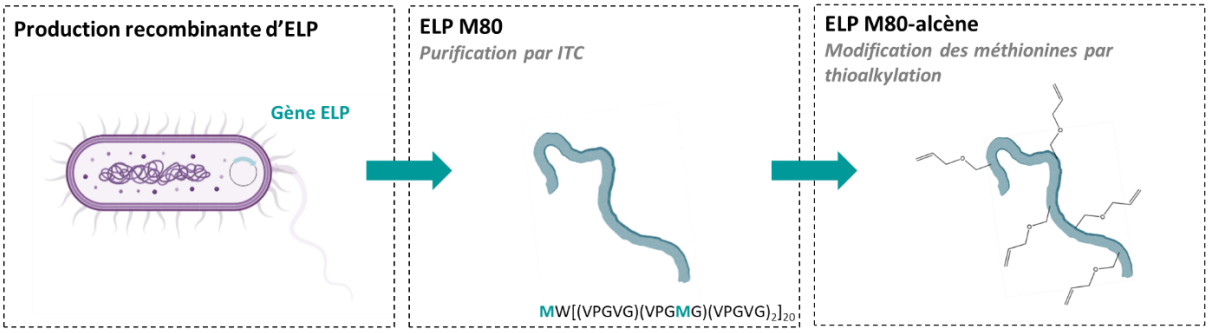


Figure 65 : Schéma représentant les principales étapes d'obtention du polymère ELP M80-alcène.

Après leur production et leur purification, les ELPs ont été modifiés de façon « chimiosélective » au niveau de leur résidus de méthionine pour y introduire des groupements alcènes (Figure 65).

Le second objectif a été de déterminer les concentrations de chaque composé (ELPs, peptides biactifs, HA) ainsi que le temps de réticulation nécessaire pour former les hydrogels. La réticulation entre les ELPs-alcènes et les peptides d'intérêt contenant des extrémités thiols a été réalisée par irradiation UV. Les peptides IKVAV et YIGSR ont été introduits pour favoriser l'ancrage cellulaire et le recrutement des

cellules vasculaires et neuronales. La séquence de clivage PVGLIG reconnue par les protéases MMP2 a été introduite entre les motifs IKVAV et YIGSR, afin de faciliter la colonisation cellulaire et la dégradation du matériau. Les hydrogels ont été obtenus à différentes concentrations en ELPs et en particule d'HA, puis ont été caractérisés par des techniques physico-chimiques pour en déterminer les caractéristiques rhéologiques, la porosité et l'interconnectivité.

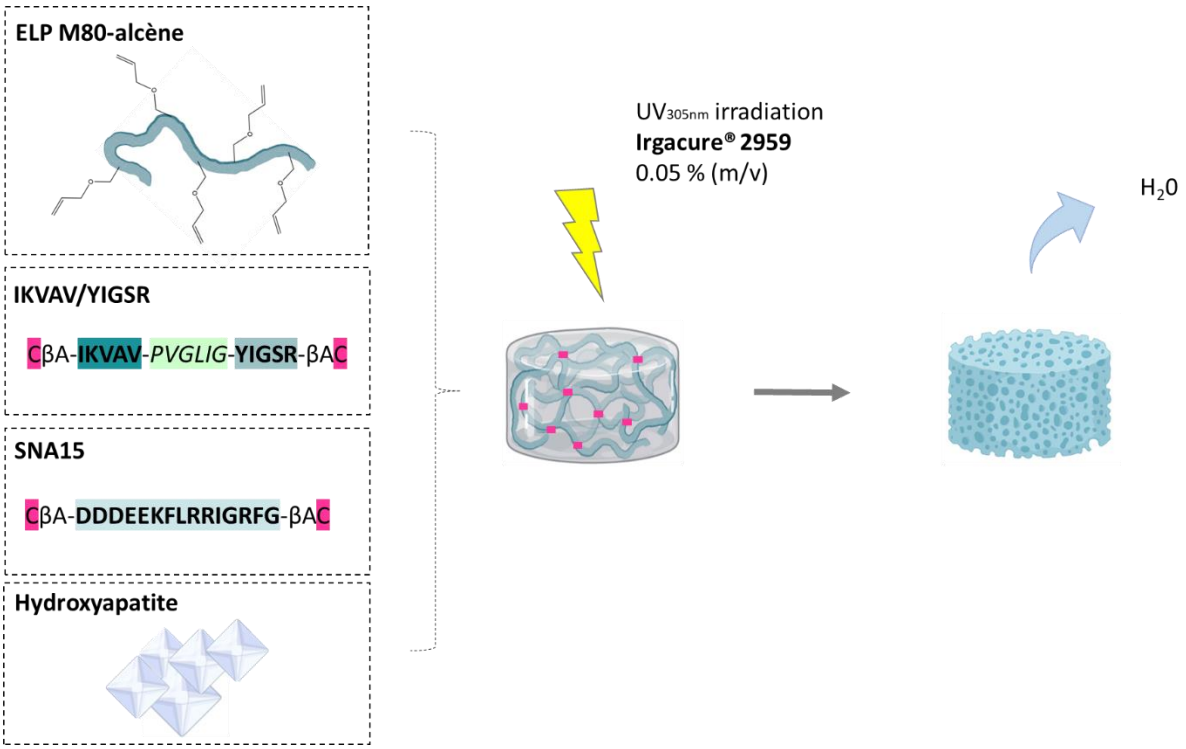


Figure 66 : Schéma représentant les composants et la méthodologie d'obtention des matrices composites à base d'ELPs, du peptide IKVAV/YIGSR, du peptide SNA15 et de l'hydroxyapatite.

Le troisième objectif a été d'évaluer la biocompatibilité et le comportement des cellules en présence des matrices sélectionnées. L'interaction avec des cellules d'intérêt comme les cellules mésenchymateuses (MSCs), les cellules endothéliales (ECs) et les neurones sensoriels (NS) a été étudiée *in vitro*. De précédents travaux dans notre équipe ont montré que les neurones sensoriels améliorent la différenciation ostéogénique des MSCs (Silva *et al*. 2017), et qu'ils ont également un effet direct sur les fonctions des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse et du remodelage de la MEC (Leroux *et al*. 2020). Dans ce travail, nous avons étudié la croissance cellulaire, la différenciation, la migration des trois types cellulaires à l'intérieur de l'hydrogel à l'aide de techniques de microscopie et d'immunocytofluorescence.

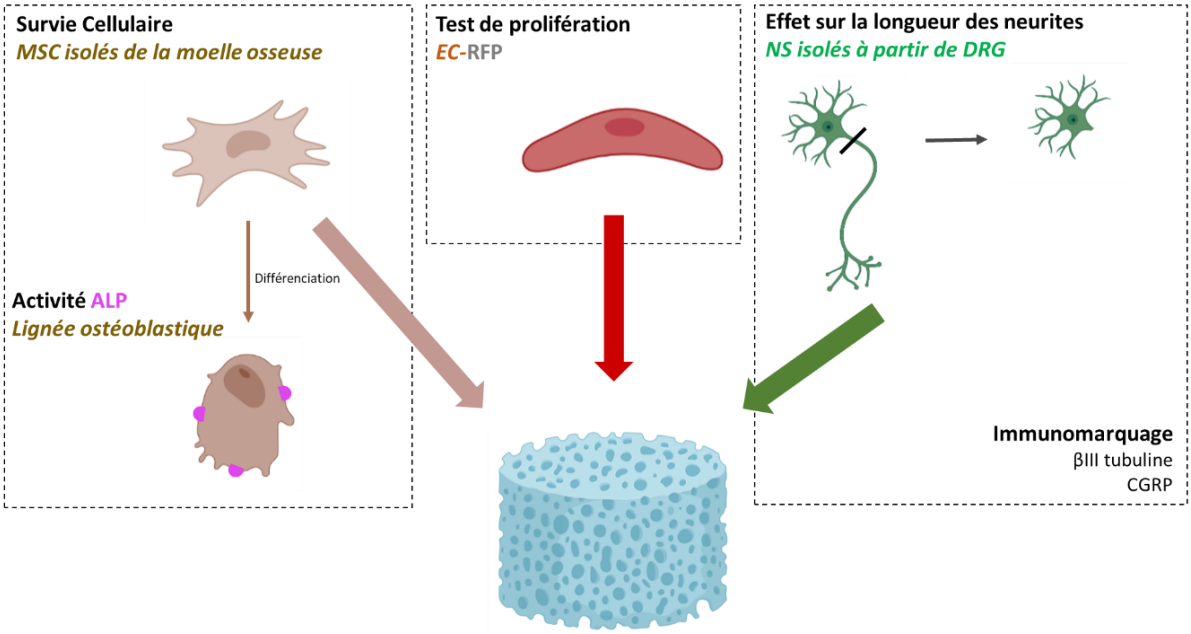


Figure 67 : Schéma représentant les tests *in vitro* réalisés sur les matrices composites.

La dernière partie de ce travail est consacrée à l'étude expérimentale chez le petit animal. Les matrices composites ayant donné les meilleurs résultats *in vitro* en termes de survie cellulaire et d'ostéoinduction ont été implantées *in vivo* chez la souris en site sous-cutané pour évaluer leur biocompatibilité, leur biodégradation, et leur capacité à promouvoir la colonisation cellulaire. Enfin, l'ostéogenèse a été évaluée après implantation dans deux modèles de lésions osseuses réalisées chez le rat : le défaut de condyle fémoral et le défaut mandibulaire.

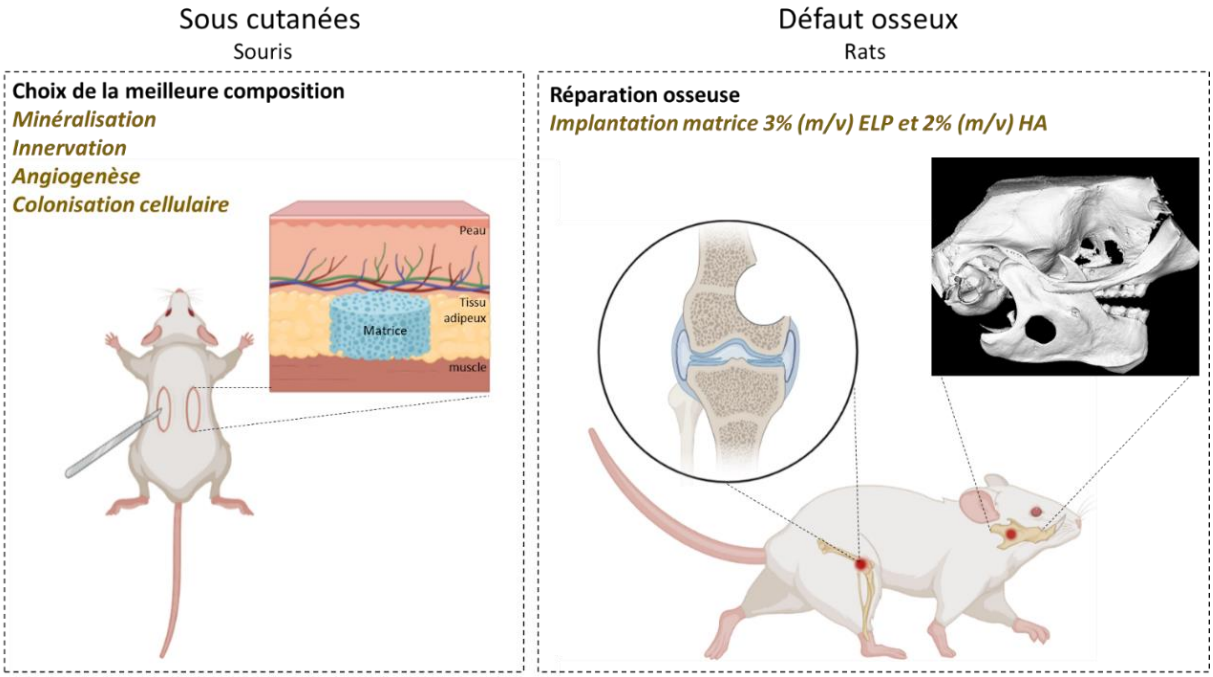


Figure 68 : Schéma récapitulant les expérimentations réalisées chez le petit animal.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont décrits dans quatre chapitres distincts, chacun comprenant i) une brève introduction, ii) une section sur le matériel et les méthodes utilisés dans le chapitre, iii) une présentation et une discussion des résultats et iv) une brève conclusion sur la partie.

Résultats

Chapitre 1 :

Production recombinante, post-modifications chimiques et caractérisation du polypeptide d'élastine.

I. Introduction

Les polypeptides analogues à l'élastine (ELPs) représentent une classe de protéines recombinantes dont les séquences sont dérivées du domaine hydrophobe de la tropoélastine. Une séquence couramment utilisée pour les ELPs est $(VPGXG)_n$, où X peut être n'importe quel résidu excepté la proline, et n est le nombre de répétitions (Urry, 1997). Cette séquence est génétiquement modulable, ce qui permet de modifier le résidu à la position X, et/ou le nombre de répétitions. Il est ainsi possible d'obtenir des ELPs ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes, ce qui permet de les adapter aux applications souhaitées.

Les ELPs sont des polypeptides thermosensibles. Ils sont caractérisés par une transition de phase qui leur est propre. En dessous de leur température de point trouble (Tcp) les monomères d'ELP sont solubles en milieux aqueux, alors qu'au-delà de leur Tcp ils s'auto-assemblent en agrégats insolubles. Ce phénomène d'agrégation est réversible, un simple refroidissement de la solution permet la dissociation des ELPs en monomères solubles. La valeur de la Tcp dépend de la nature du résidu X, de la masse moléculaire de l'ELP, et des concentrations en sels de la solution dans laquelle ils sont dissous. Les ELPs sont biocompatibles et biodégradables (Shah *et al.*, 2012), ce qui en fait des candidats de choix pour des applications biomédicales. Leur capacité thermosensible a été exploitée afin de les isoler, de les purifier et de contrôler leur auto-assemblage. Notre laboratoire a produit plus d'une trentaine d'ELPs différents depuis 2015, qui diffèrent par leur taille, la nature du résidu X, et leur composition (monoblocs, diblocs et triblocs). Pour notre projet, nous avons choisi d'utiliser les ELPs de la série M, qui contiennent soit une méthionine soit une valine à la position X dans un rapport de 3 valine pour une méthionine. En effet, il avait préalablement été montré que ces ELPs pouvaient être modifiés au niveau de leur méthionine pour y greffer des groupements chimiques réactifs (Dai, Belaïdi, *et al*. 2021; Ibrahimova *et al*. 2021; Levêque *et al*. 2022b; Xiao *et al*. 2020; Zhao *et al*. 2021; Zhao *et al*. 2020). La méthionine est un acide aminé dont la chaîne latérale comprend un atome de soufre engagé dans une fonction thioéther (R1-S-R2), ainsi qu'un groupe méthyle ($-CH_3$). L'atome de soufre des résidus méthionines peut être utilisé pour la modification « chimiosélective » des ELPs, ce qui est un moyen aisé pour moduler rapidement les propriétés thermo-réactives (modification de la Tcp), ou introduire de nouvelles fonctionnalités sans avoir recours à de longues étapes de clonage pour changer la nature de l'acide aminé X. La valine est un acide aminé dont la chaîne latérale est composée d'un groupe apolaire isopropyle ne présentant aucune réactivité chimique particulière. La valine a donc, ici, essentiellement un rôle d'espaceur des résidus méthionines réactifs. D'autre part, sa nature hydrophobe confère à l'ELP une température de point trouble peu élevée.

Les ELPs de la série M contiennent des résidus de méthionine périodiquement espacés toutes les quatre répétitions du motif pentapeptidique VPGXG. On peut ainsi les retrouver sous la nomenclature MW[(VPGVG)(VPGMG)$(VPGVG)_2]_n$, où n correspond au nombre de répétitions du pentapeptide.

Le premier objectif de ce travail a été de produire et caractériser le polymère recombinant servant de base aux hydrogels. Nous avons choisi de produire des ELPs comportant un nombre de répétitions importants (40 ≤ n ≤ 100), afin d'avoir un nombre de sites de liaison suffisant pour la formation des hydrogels.

Le second objectif a été de modifier les résidus méthionine en introduisant des fonctions alcènes par réaction de thioalkylation. Ces résidus alcènes sont nécessaires pour notre stratégie de formation des hydrogels par réaction thiol-ène.

II. Matériels et méthodes.

1.1. Conception de la séquence codant l'ELP M80 et clonage.

1.1.1. Ligature directionnelle récursive (RDL) dans le vecteur de clonage pUC19 et obtention du vecteur de clonage pUC19-ELP M80.

Un gène synthétique codant la séquence du polypeptide MW[(VPG**V**G)(VPG**M**G)$(VPG\mathbf{V}G)_2]_5$, appelé ELP M20, a été synthétisé par la société Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne). Ce gène a été utilisé pour obtenir la séquence codant l'ELP MW[(VPG**V**G)(VPG**M**G)$(VPG\mathbf{V}G)_2]_{20}$, ou ELP M80, en utilisant la technique de Ligature Directionnelle Récursive (RDL, Meyer et Chilkoti 2002).

Figure 1 : Séquence nucléique codant l'ELP M20 MW[$(VPGVG)_2$(VPGMG)(VPGVG)]$_5$.

La séquence codant l'ELP M80 est indiquée par le code à une lettre. Les sites de reconnaissance des enzymes de restrictions sont soulignés. Les sites de coupures des enzymes de restriction de type II utilisées sont représentés par un triangle noir, et ceux des enzymes de type IIs (*Bsm*FI et *BtgZ*I) sont représentés par des flèches oranges et violettes.

Obtention du vecteur de clonage pUC19-ELP M80.

Brièvement, une première séquence nommée $M_{20\ insert}$ correspondant à la séquence d'ADN $[(VPG\mathbf{V}G)_2(VPG\mathbf{M}G)(VPG\mathbf{V}G)]_5$ (séquence A, Figure 2) est insérée dans le plasmide receveur pUC19 contenant la séquence codant l'ELP M60 (pUC-M60) préalablement obtenue au laboratoire.

5 µg du plasmide $M_{20\ insert}$ ont été digérés par les enzymes *Btg*Z1 (5 unités, pendant 1 h à 60 °C) et *Bsm*F1 (2 unités, pendant 1 h à 65 °C) dans du tampon CutSmart Restriction Enzyme de chez Biolabs© (50 mM d'acétate de potassium, 20 mM Tris-acétate, 10 mM Acétate de magnésium, 0,1 mg/mL de BSA, pH 7,9). Après séparation des fragments par électrophorèse dans un gel d'agarose 0,8 %, l'insert a été purifié grâce au kit Macherey Nagel©. En parallèle, le plasmide pUC19-M60 (1,7 µg) a été digéré par l'enzyme *Bsm*FI (2 unités pendant 1 h à 65 °C dans du tampon CS 10X), puis déphosphorylé par la phosphatase antarctique (5 unités, pendant 30 min à 37 °C puis 3 min à 80 °C) avant d'être purifié après électrophorèse en gel agarose 0,8 % dans un tampon de migration TAE (Euromedex©) (Tris-HCl 40 mM pH 8, acide Acétique 20 mM, EDTA 1mM).

Ligation de l'insert M20 dans le vecteur pUC19-ELP M60.

116 ng du vecteur déphosphorylé et 56 ng d'insert M20 (rapport molaire 1:3) ont été ligués par 1 µL de Quick T4 DNA Ligase (NEB®) dans le tampon de ligation (66 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 1 mM Dithiothréitol, 1 mM ATP, 7,5 % Polyéthylène glycol (PEG6000), pH 7,6) pendant 5 min à température ambiante.

Transformation des bactéries compétentes Stellar par le plasmide pUC19-ELP M80.

Les cellules compétentes Stellar™ de Clontech® (*F-, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ*–) ont été utilisées. Elles ont été transformées par 5 µL du produit de ligation.

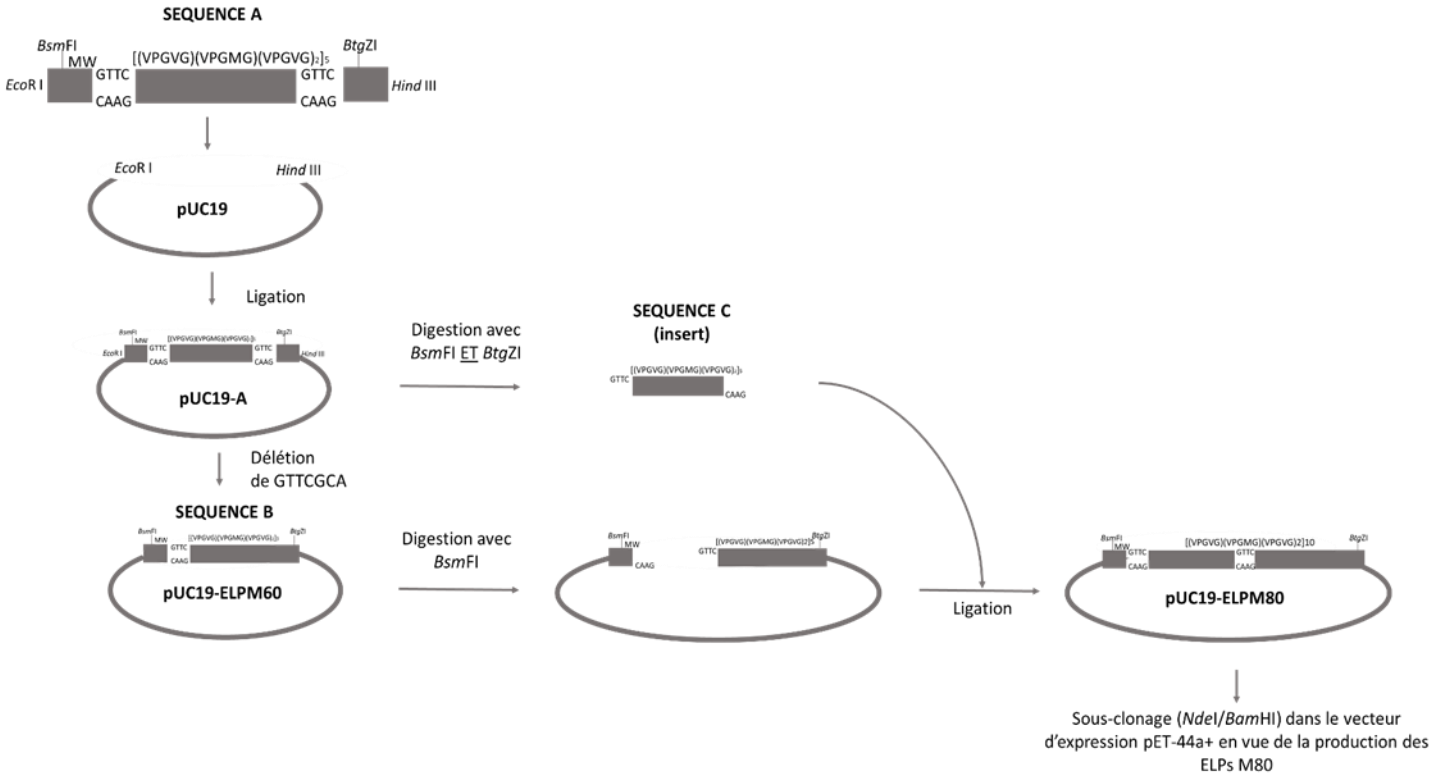


Figure 2 : Stratégie de clonage pour l'obtention du clone codant l'ELP M80.

La séquence codant l'ELP M20 MW$[(VPGVG)_2(VPGMG)(VPGVG)]_5$ ainsi que les bases additionnelles avaient préalablement été insérées dans le vecteur de clonage pUC19 (nommé pUC19-A). La séquence codant l'ELP M60 MW$[(VPGVG)_2(VPGMG)(VPGVG)]_{15}$ est nommée pUC19-ELPM60. La séquence codant l'ELP M20 a été double digérée par les enzymes de restriction *BsmFI* et *BtgZI*, et le vecteur receveur pUC19-ELPM60 par l'enzyme *BsmFI*. Ces deux séquences aux extrémités compatibles ont été liées par la Quick Ligase pour obtenir le vecteur pUC19-ELP M80.

Les colonies positives ont été identifiées par PCR en utilisant les amorces M13 FP (5'-TGTAAAACGGCCAGT-3') et M13 RP (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'). Les 30 cycles d'amplification ont été réalisés par l'ADN polymérase OneTaq®(Biolabs®) avec les étapes suivantes : 94 °C pendant 15 sec, puis 50 °C pendant 30 sec et enfin 68 °C pendant 1 min 20. Tous les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (m/v). Les plasmides présents dans les clones positifs ont été ensuite purifiés à l'aide du kit Nucleospin® Plasmid NoLid (Macherey Nagel®), puis séquencés par la société GATC Biotech© (Allemagne).

1.1.2. Sous clonage de la séquence codant l'ELP M80 dans le vecteur d'expression pET44.

Isolement et purification du plasmide pET44 et de l'insert codant l'ELP M80.

L'insert *Nde*I-*Bam*H1 et le vecteur linéarisé ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%. Les fragments d'ADN ont été révélés par coloration au SYBR© Safe DNA gel strain (Thermo Fisher Scientific©). La zone du gel contenant les fragments d'ADN d'intérêt a été découpée afin d'en extraire l'ADN, et les fragments ont été purifiés grâce au kit NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Macherey Nagel©).

Clonage dans le vecteur d'expression pET44 de la séquence codant l'ELP M80.

Les séquences ELP d'intérêt ont été extraites du plasmide pUC19-M80 par double digestion *Nde*I et *Bam*HI (2 h à 37 °C dans le tampon Cut Smart), purifiées après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % puis ligaturées avec le kit Quick ligation™ dans un plasmide pET44a(+) préalablement digéré par les mêmes enzymes et déphosphorylé par la phosphatase antarctique (15 min à 37 °C). Les produits de ligation ont ensuite été utilisés pour transformer des cellules compétentes *E.coli* NEB5α-F'Iq (*F´, proA+B+, lacIq, Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR) / fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA, glnV44, Φ80Δ(lacZ)M15, gyrA96, recA1 relA1 ; endA1, thi-1, hsdR17*). Les clones positifs ont été identifiés par criblage PCR (94°C pendant 3 min, puis 30 cycles : 94 °C - 15 sec, 58 °C - 30 sec et 68 °C - 1min) avec l'ADN polymérase OneTaq® (Biolabs®) et les amorces pET7D (5'-CGAGATCGATCTCGATCCCG-3') et pET7G (5'-ACAGAATTCGGATCCACGAG-3').

Les plasmides pET-M80 ainsi obtenus ont été vérifiés par séquençage (GATC Biotech©, Allemagne). Ils ont ensuite été utilisés pour transformer des cellules compétentes BLR(DE3) (*F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal lac ile dcm Δ(srl-recA)::Tn10 (tetR)(DE3)*) pour obtenir les clones producteurs.

2.2. Production de l'ELP M80 par *Escherichia coli.*

Une colonie bactérienne a été sélectionnée et mise en pré-culture pendant une nuit à 37 °C et à 200 rpm dans 100 mL de milieu LB Lennox (1 % bacto-tryptone, 5 % NaCl et 1 % d'extrait de levure) contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Cette pré-culture a ensuite été ensemencée dans 1 L de milieu LB contenant 1 g/L de glucose et 100 µg/mL d'ampicilline. La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm avec un spectrophotomètre (Ultrospec 10, Amersham Biosciences). Lorsque la DO_{600} a atteint une valeur de 0,8, la production de la protéine recombinante a été induite par ajout de l'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à une concentration finale de 0,5 mM, et la température de l'incubateur a été diminuée à 25 °C. La DO de la culture a ensuite été mesurée à 2 h, 4 h, 6 h et 22 h après induction par l'IPTG, et l'expression des ELPs a été analysée par gel SDS-PAGE (4-20 %, Mini-PROTEAN® TGX).

2.3. Purification de l'ELP M80 par Cycle de Transition Inverse (ITC).

2.3.1. *Récolte bactérienne et lyse cellulaire.*

22 h après induction par l'IPTG, les bactéries ont été centrifugées pendant de 15 min à 3000 g et 4 °C, puis le culot a été resuspendu dans de l'eau milliQ (20 mL/g de culot). Afin de fragiliser les membranes bactériennes, la suspension cellulaire a été congelée 15 min à -80 °C, puis décongelée à température ambiante.

La lyse cellulaire a été complétée par sonication. Les échantillons ont été placés sur la glace, et les cycles de sonication étaient les suivants : 4 sec à 125 W puis 8 sec de repos, sur une durée totale de 10

min. Une fraction aliquote, dite lysat cellulaire, a été mise de côté, puis le reste de la solution a été centrifugé à 7 000 g à 4 °C pendant 20 min afin d'éliminer les débris insolubles. Le surnageant contenant les protéines solubles (appelée fraction soluble) a été récupéré pour la suite de la purification, et une fraction aliquote a été mise de côté pour analyse par SDS-PAGE.

2.3.2. *Purification de l'ELP M80 par « Inverse Transition Cycling » (ITC).*

La fraction soluble a été soumise à trois cycles successifs d'ITC. Un cycle d'ITC correspond à une série de centrifugations (10 000 g – 10 min) réalisées à différentes températures. La première, dite à chaud, se fait à 30 °C (hot spin ou HS) alors que la seconde, à froid, se fait à 4 °C (cold spin ou CS). Durant les centrifugations à chaud, les ELPs précipitent car la température excède leur Tcp, ce qui permet de les récupérer dans les culots. Ces culots sont ensuite resuspendus dans de l'eau froide pour permettre la solubilisation des ELPs. Après les centrifugations à froid, les ELPs solubilisés se retrouvent donc dans les surnageants.

Tous les surnageants ont été mis de côté afin d'analyser leur contenu protéique par SDS-PAGE. La concentration de chaque ELP a été mesurée avec un spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific ®), en utilisant les valeurs suivantes : ε_{280nm} = 5500 $M^{-1}.cm^{-1}$ et masse moléculaire = 33,7 kDa (ces valeurs ont été obtenues grâce au logiciel ProtParam ®, ExPASy).

2.4. Modifications chimiosélectives des résidus de méthionine de l'ELP M80.

2.4.1. *Modification des méthionines par réaction de Thioalkylation.*

L'ELP M80 contenant 21 résidus de méthionine a été thioalkylé afin de greffer des groupes alcène. L'ELP a été dissous à une concentration de 20 mg/mL dans un mélange acide acétique / hexafluoroisopropanol (AcOH/HFIP) (9:1, v/v), puis le tout a été dégazé en faisant buller de l'argon dans la solution pendant 10 min. Du 1-allyloxy-2,3-époxypropane (contenant une fonction époxyde hautement réactive) (Sigma®) a été ajouté en 3 fois (0 h, 24 h et 36 h après le lancement de la réaction) avec 10 équivalents par résidu de méthionine. La réaction se fait sous agitation, pendant 48 h à température ambiante et sous argon pour éviter l'oxydation des méthionines.

Le mélange réactionnel est ensuite dilué au demi, puis purifié par filtration avec des unités Amicon® Ultra-15 3K Centrifugal Filter Devices (Millipore®) en suivant les instructions du fournisseur. Les ELPs contenant les résidus de méthionine thioalkylés sont récupérés dans le rétentat, puis lyophilisés pendant 48 h.

2.4.2. *Déméthylation des méthionines préalablement thioalkylées.*

20 mg d'ELPs ont été dissous dans 1 mL d'éthanol à 75 % (AnalaR NORMAPUR® ACS), puis 5 mg de pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (APDC, 98 %, ACROS Organics™) ont été ajoutés, soit 5 équivalents par résidu de méthionine. La solution a été agitée sous Argon pendant 24 h à température ambiante.

Le mélange obtenu a ensuite été dialysé (MWCO de 1 kDa,) contre 50 % de MeOH (aq) pendant 24 h (3 changements de solvant), puis contre de l'eau Milli-Q pendant 8 h (3 changements de milieu). Le produit a ensuite été lyophilisé.

2.5. Caractérisation des ELPs.

2.5.1. *Mesure des températures de point trouble des ELPs.*

La température de point trouble (Tcp) a été déterminée en mesurant la turbidité à 350 nm entre 15 et 50 °C. L'incrément de température était de 1 °C/min. Les ELPs ont été dissous soit dans un tampon Tris 10 mM à pH 8, soit dans un tampon PBS 1X (NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4). Les mesures ont été réalisées avec un spectrophotomètre UV-visible Cary 100 Bio. La Tcp a été définie comme la température correspondant au maximum de la première dérivée de la courbe de turbidité en fonction de la température.

2.5.2. *Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^{1}H).*

Les expériences de RMN ^{1}H ont été effectuées dans du D_2O (99,90 % D, Eurisotop ®) avec une concentration d'ELP de 8 mg/mL.

Lorsque les ELPs étaient solubles à température ambiante (échantillon non trouble, T<Tcp), les expériences ont été faites à 298 K avec un appareil Bruker AVANCE III HD 400 équipé d'une sonde directe multinucléaire Bruker de 5 mm fonctionnant à 400,2 MHz. Lorsque les ELPs étaient non solubles à température ambiante, les analyses ont été effectuées à 278 K sur un spectromètre Bruker AVANCE NEO 400 fonctionnant à 400,3 MHz, équipé d'une tête de cryosonde directe Bruker à gradient z multi nucléaire fonctionnant à 278 K.

Tous les spectres RMN ^{1}H ont été enregistrés avec une acquisition temps de 4 s, un délai de relaxation de 2 s, et 128 balayages à 298 K ou 64 balayages à 278 K.

Le signal H_2O dans le D_2O a été utilisé comme signal de référence (d = 4,79 ppm). Le traitement des données a été effectué à l'aide du logiciel Bruker Topspin®.

2.5.3. *Caractérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).*

La dispersité des ELPs a été vérifiée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Cette méthode de chromatographie en phase liquide permet de séparer des macromolécules en fonction de leur

volume hydrodynamique. Le solvant utilisé comme éluant était composé à 65 % d'un mélange d'acide acétique (AcOH) 0,3 M et d'acétate d'ammonium (AcONH4) 0,2 M, les 35 % restant correspondant à de l'acétonitrile (ACN). Les mesures ont été effectuées sur un système Ultimate 3000 (Thermoscientific®) équipé d'une triple détection : un détecteur à réseau de diodes (DAD), un détecteur de diffusion de lumière multi-angles (MALS, 18 angles) et un détecteur dRI d'indice de réfraction différentiel (Wyatt® Technology).

Les ELPs ont été séparés sur deux colonnes successives de TOSOH : une colonne G4000PWXL (7,8*300) avec des limites d'exclusion comprises entre 2 kDa et 300 kDa, puis une colonne G3000PWXL (7,8*300) avec une limite d'exclusion inférieure à 40 kDa. Les mesures ont été effectuées à un débit de 0,6 mL/min, la température des colonnes étant maintenue à 26 °C. L'éthylène glycol a été utilisé comme référence. Les données ont été traitées avec le logiciel Astra® (Wyatt® Techology).

2.5.4. *Caractérisation par Analyse Thermo-Gravimétrique (ATG).*

La caractérisation par analyse thermogravimétrique est une technique d'analyse thermique qui consiste à mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction du temps, pour une température ou un profil de température donné. Cette technique nous permet d'avoir accès à la quantité de composés organiques et inorganiques dans l'échantillon d'ELP, et donc d'estimer la quantité de résidus de sels (NaCl) restante après les étapes de purification.

Environ 5,5 ± 0,5 mg d'ELPs ont été analysés sur un appareil Q500 (TA Instruments®), et la perte de masse de chaque échantillon a été mesurée en fonction de la température. Les mesures ont été effectuées dans un premier temps sous un flux d'azote de 100,0 ± 0,5 $cm^3.min^{-1}$ en augmentant la température de 10 °$C.min^{-1}$ entre la température ambiante et 600 °C, puis sous un flux d'oxygène de 600 à 900 °C dans les mêmes conditions.

2.5.5. *Caractérisation par Spectrométrie de masse ESI-MS.*

Les analyses par spectrométrie de masse (ESI-MS) ont été réalisées sur un ESI-QTOF (Q-TOF Premier, Waters, Manchester, UK). Les ELPs lyophilisés ont été remis en suspension dans une solution d'acétonitrile/0,1 % d'acide formique aqueux (1:1 v/v)(Thermo Fisher Scientific®) jusqu'à une concentration finale d'environ 30 µmol/L. Les ELPs ont ensuite été infusés dans la source d'ionisation électrospray à un débit de 5 µL/min. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode positif après un étalonnage externe réalisé avec une solution de la protéine standard (concentration de 1 µmol/L). Les spectres de masse ESI ont montré la distribution caractéristique des états de charge correspondant aux ELPs recherchés et à leurs dérivés. Les données ont ensuite été traitées avec le système de déconvolution à entropie maximale MaxEnt (logiciel MaxEnt, Waters) pour déterminer les masses moléculaires.

III. Résultats.

Les ELPs sont produits de manière recombinante dans des hôtes hétérologues à l'aide de vecteurs plasmidiques. Pour nos travaux, la bactérie *E.coli* a été choisie comme système d'expression car les ELPs ne nécessitent pas de modifications post-traductionnelles complexes (glycosylation, formation de ponts disulfures), et ils ne sont pas toxiques pour ces bactéries. Par ailleurs, la production de protéines recombinantes en bactéries est plus rapide et moins coûteuse qu'avec les autres systèmes d'expression.

Les ELPs sont des polypeptides recombinants dont les séquences codantes contiennent de nombreuses répétitions, ce qui n'est pas un gage de stabilité après introduction dans un hôte bactérien. Pour limiter les répétitions au sein des séquences nucléiques, il est possible de jouer avec le code génétique en variant l'utilisation des différents codons pour un même acide aminé. Toutefois, cette technique est limitée car les séquences d'ADN codant les ELPs sont très fortement répétées, et certains acides aminés comme la méthionine ne sont codés que par un seul codon (ATG). D'autre part, la présence de ces répétitions empêchent le recours aux techniques modernes de clonages comme l'assemblage Gibson (Gibson *et al*. 2009) ou la PCR, car elles sont basées sur le principe de l'hybridation moléculaire qui nécessite l'existence de séquences non répétées.

Ainsi la synthèse des gènes codant les ELPs constitués de plus de 20 répétitions de pentapeptide recours à des méthodes plus classiques basées sur l'utilisation d'enzymes de restriction. L'inconvénient de ces techniques est qu'elles sont plus complexes à concevoir et plus fastidieuses à mettre en œuvre. En outre, ces stratégies de type « copier/coller » peuvent entraîner l'apparition de « cicatrices » entre les répétitions, ce qui se traduit par l'ajout d'acides aminés entre les différentes sous-unités assemblées. Pour éviter cela, nous avons choisi d'utiliser des enzymes de restrictions de type IIS. Ces dernières reconnaissent une séquence spécifique d'ADN mais coupent en dehors de leur séquence de reconnaissance. En plaçant de tels sites de restriction à des endroits judicieusement choisis, nous pouvons couper une séquence initiale, comme celle de l'ELP M20, et l'ajouter de façon séquentielle à un plasmide contenant une séquence identique. Ainsi, nous pourrons obtenir successivement les ELPs M40, M60, M80 et M100 sans ajouter d'acides aminés surnuméraires entre les blocs.

3.1. Synthèse des gènes codant de « nouveaux » ELP (M80 et M100).

Le clone contenant la séquence codant l'ELP M20, séquence de base permettant d'obtenir tous les autres ELPs de la série, avait été construit préalablement à mon arrivée au laboratoire par Bertrand Garbay et Laure Bataille. Ce clone avait également été utilisé pour obtenir les séquences codant les ELPs M40 (Petitdemange *et al*. 2017) et M60 (Dai *et al*. 2021).

Le but de cette partie de mon travail a été d'obtenir des ELPs de plus grandes tailles (ELP M80 et M100). En effet, nous avons déjà vu dans l'introduction que la valeur de la Tcp peut varier en fonction de la taille de l'ELP. Le groupe de Chilkoti (Meyer & Chilkoti 2004) a démontré que plus la masse moléculaire d'un ELP est grande, moins l'effet de la concentration sur la valeur de la Tcp est importante. En partant de ce postulat, il a été décidé de travailler avec des ELPs de la série M ayant des masses moléculaires plus importantes afin de diminuer l'effet de la concentration, et donc d'avoir une valeur de Tcp quasiment constante. Ceci est d'autant plus important que les ELPs obtenus seront utilisés pour développer des hydrogels à différentes concentrations. Il était donc souhaitable que les propriétés rhéologiques ne varient pas trop en fonction de la température d'un gel à l'autre. Le second avantage d'avoir des ELPs plus longs, est que l'on augmente le nombre de points de réticulation pour la formation des hydrogels.

Les clones bactériens contenant les séquences nucléotidiques codant les ELPs M80 et M100 ont été obtenus par la technique de RDL telle que décrite dans le paragraphe suivant.

La séquence nucléotidique codant l'ELP M60 de séquence MW[(VPGVG)(VPGMG)$(VPGVG)_2]_{15}$ avait été préalablement clonée dans le vecteur pUC19 (plasmide ELP M60-pUC19). Ce dernier a été digéré par l'enzyme de restriction *BsmF1* afin de le linéariser, puis déphosphorylé par l'enzyme phosphatase antarctique pour éliminer les phosphates en position 5' et donc éviter la re-circularisation du vecteur sur lui-même. En parallèle, comme la séquence nucléotidique codant l'ELP M20 MW[(VPGVG)(VPGMG)$(VPGVG)_2]_5$ avait déjà été clonée dans le vecteur pUC19, ce plasmide a été double digéré par les enzymes de restriction *Bsm*F1 et *Btg*ZI de manière à séparer la séquence $[(VPGVG)(VPGMG)(VPGVG)_2]_5$ du reste du plasmide.

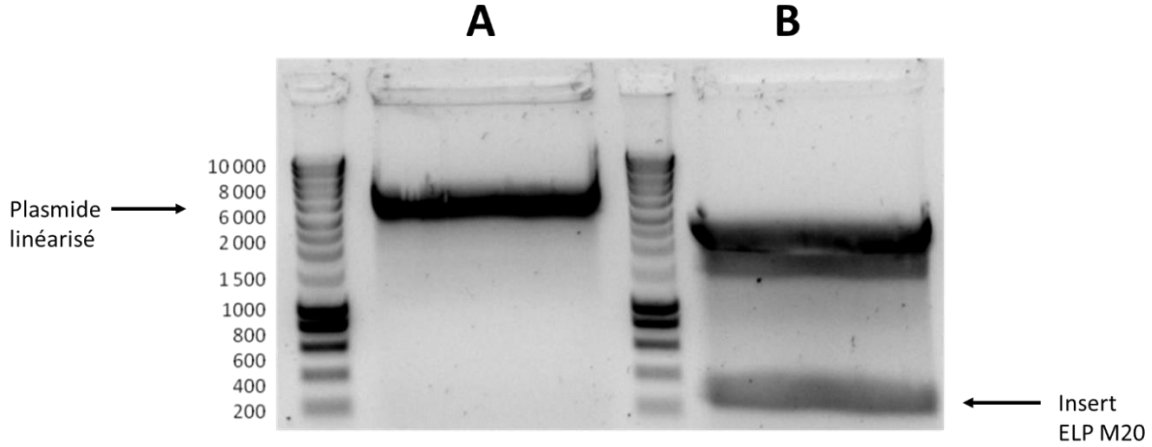


Figure 3 : Gel d'électrophorèse représentant le plasmide ELP M60-pUC19 digéré par *Bsm*F1 (A), et le plasmide ELP M20-pUC19 digéré par *Btg*Z1 et *Bsm*FI (B).

Les plasmides ELP M60-pUC19 et M20-pUC19 ont été digérés respectivement par les enzymes de restriction *Bsm*FI ou *Bsm*FI et *Btg*ZI. Ils ont été déposés sur gel électrophorèse 0,8 % d'agarose afin de séparer les fragments d'intérêts (représentés par les flèches noires). La flèche de gauche correspond au plasmide ELP M60-pUC19 linéarisé. La flèche de droite indique l'insert ELP M20. Cet insert correspond à la séquence $[(VPGVG)(VPGMG)(VPGVG)_2]_5$ dépourvue de la séquence correspondant aux acides aminés MW côté N-terminal du polypeptide.

Les deux plasmides digérés ont ensuite été déposés sur gel d'agarose en vue de la séparation des fragments d'intérêts qui correspondent au plasmide ELP M60-pUC19 linéarisé et déphosphorylé ainsi qu'à l'insert M20 (Figure 3). L'insert M20 migre à la taille attendue de 306 pb et le plasmide linéarisé à environ 3500 pb. Ces deux fragments ont ensuite été extraits du gel d'agarose, puis purifiés sur colonne échangeuse d'ions.

Une fois l'insert M20 et le plasmide ELP M60-pUC19 purifiés et quantifiés, ils ont été liés par l'enzyme Quick T4 ligase afin d'obtenir le plasmide ELP M80-pUC19. Ce nouveau plasmide a été transformé dans des bactéries *E.coli* compétentes. Une PCR sur colonies a ensuite été effectuée pour mettre en évidence les clones positifs, c'est-à-dire les bactéries ayant incorporé le plasmide ELP M80-pUC19. Douze clones ont été criblés (Figure 4).

On observe que les clones 1, 4, 5, 8 et 9 n'ont pas incorporé le plasmide ELP M80-pUC19. En effet les fragments amplifiés migrent entre 800 et 1000 pb. Cela pourrait correspondre à la taille des amplifiats obtenus à partir de la matrice M60-pUC19 (plasmide receveur) car la taille attendue pour les amplifiats de la séquence codant l'ELP M60 amplifiée est de 921 pb, ces clones sont donc dits « négatifs ».

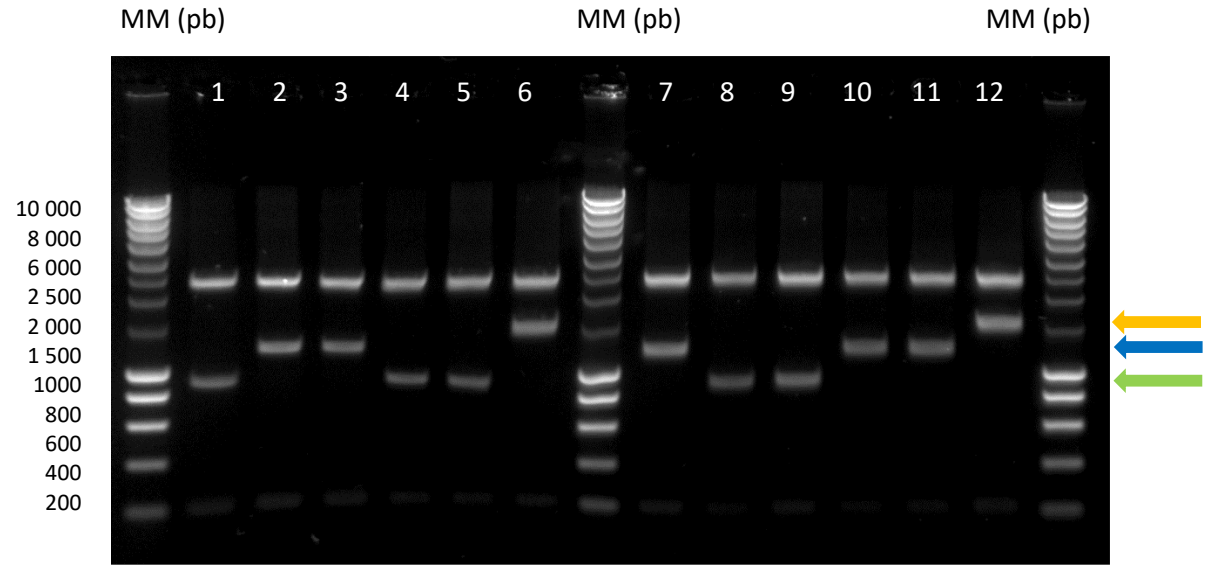


Figure 4 : Gel d'électrophorèse (1,5% agarose) des produits de PCR obtenus après le criblage sur colonies.

Les flèches bleues et jaunes indiquent respectivement les tailles attendues pour les plasmides contenant les séquences de l'ELP M80 (1221pb) et de l'ELP M100 (1521pb). La flèche verte représente le fragment amplifié pour le plasmide contenant la séquence de l'ELP M60 (921 pb). Les colonnes correspondant au marqueur de taille en pb sont indiquées.

Les produits de PCR obtenus à partir des clones 2, 3, 7, 10 et 11 migrent à environ 1250 pb, ce qui correspond à la taille attendue avec le plasmide ELP M80 (taille théorique de l'amplifiat = 1221 pb). Fait surprenant, nous observons que les amplifiats issus des clones 6 et 12 ont migré légèrement au-dessus de 1500 pb, ce qui pourrait indiquer qu'ils correspondent à des séquences d'ELP M100 (taille

théorique des produits de PCR = 1521 pb). Les clones codant les séquences des ELPs M80 et M100 sont dits « positifs ».

À l'issue de ce criblage par PCR, les plasmides des clones positifs ont été purifiés et séquencés. Les séquences codant les ELPs M80 et M100 ont ensuite été sous-clonées dans le vecteur d'expression pET44a.

3.2. Production et purification des polypeptides ELPs M80 et M100.

Suite à l'obtention des clones M80 et M100, la première étape a été de vérifier qu'ils permettaient d'exprimer les protéines d'intérêt. Des tests d'expression sur des petits volumes de culture (50 mL) ont alors été réalisés. Après induction par l'IPTG, la température de l'incubateur a été diminuée à 25°C afin de ralentir la croissance bactérienne et éviter un encombrement métabolique lié à la surexpression de la protéine recombinante. Nous avions en effet préalablement montré que la production des ELPs M40 et M60 était favorisée par un tel changement de température. Les cultures ont été poursuivies 20 h après l'induction, et des échantillons ont été prélevés pendant la période de production pour analyse.

Les ELPs ont ensuite été purifiés par la technique de Cycle de Transition Inverse (ITC) qui utilise leur propriété de thermosensibilité. L'ITC offre des avantages techniques en termes de rapidité de purification et de coût par rapport aux méthodes chromatographiques de purification de protéines (Meyer and Chilkoti, 1999). Après la culture, les bactéries sont récoltées par centrifugation, re-suspendues dans un tampon PBS, lysées par une première étape de congélation/décongélation puis par une étape de sonication à 4°C (pour éviter l'agrégation des ELPs). L'homogénat est ensuite centrifugé pour séparer le culot, contenant les débris cellulaires et les protéines insolubles, du surnageant qui contient les molécules solubles (fraction soluble). Les ELPs sont ensuite purifiés à partir de cette fraction soluble par la technique d'ITC précédemment décrite. Les travaux précédents réalisés au laboratoire avec les ELPs M20, M40 et M60 avaient montré que la température des étapes à chaud ne devait pas être trop élevée. En effet, si ces ELPs sont incubés à des températures supérieures à 40°C pendant plusieurs minutes, cela peut entraîner une oxydation des résidus méthionine en sulfoxides qui peut toucher jusqu'à 86 % des résidus (Petitdemange *et al*. 2017). Or cette oxydation des méthionines a deux conséquences. La première est que l'oxydation des méthionines en sulfoxides diminue grandement l'hydrophobicité des ELPs, ce qui se traduit par une augmentation de leur Tcp. Dans les cas extrêmes où 100 % des résidus méthionines de l'ELP M40 sont oxydés on observe une disparition de la Tcp. C'est un inconvénient majeur pour les étapes de purification par ITC qui est basée sur l'agrégation des ELPs à une T supérieure à leur Tcp. La seconde conséquence est que l'oxydation empêcherait l'étape ultérieure de couplage chimique. Comme précédemment expliqué, notre objectif

est de greffer des peptides sur les résidus méthionine des ELPs. Or, ce greffage passe par une première étape d'époxydation des méthionines, réaction qui ne peut pas fonctionner si les soufres des méthionines sont oxydés en sulfoxides.

Pour limiter ces problèmes d'oxydation, nous avons opté pour la stratégie suivante. Tout d'abord, du sel est ajouté pendant les premières étapes d'ITC, là où les ELPs sont les moins concentrés, de manière à diminuer leur Tcp (Petitdemange *et al*. 2017). D'autre part, à chaque cycle d'ITC nous divisons par deux, comparativement au cycle précédent, le volume de reprise du culot obtenu après la centrifugation à chaud. Cela permet d'augmenter au fur et à mesure la concentration en ELPs, et donc de diminuer leur Tcp. Il faut toutefois noter que cette dernière précaution est moins importante pour les ELPs M80 et M100 que pour ceux de plus petite taille, l'effet de la concentration sur la Tcp étant moins prononcée pour les ELPs de haute masse moléculaire (Meyer & Chilkoti 2004). En procédant de cette manière, nos échantillons n'ont jamais été chauffés sur de longues périodes à des températures supérieures à 40°C, limitant ainsi les risques d'oxydation.

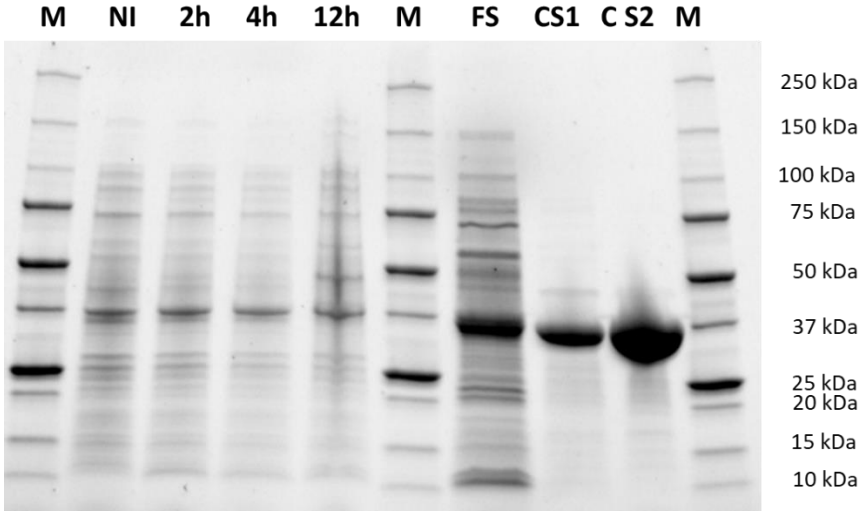


Figure 5 : Suivi de production et de purification du polypeptide recombinant ELP M80 sur gel électrophorèse en condition dénaturante SDS-PAGE (4-20%)

Les différentes fractions issues de la purification par ITC (Cycle de Transition Inverse) des ELPs M80 ont été soumises à une électrophorèse en conditions dénaturantes. 10 µg de chaque fraction ont été déposés par piste. **M** : marqueur de masse moléculaire. **Suivi de production - NI** : culture non-induite par l'IPTG. **2h**, **4h** et **12h** : échantillons protéiques de culture induite respectivement 2, 4 et 12h par de l'IPTG. **Suivi de purification - FS** : fraction soluble d'une culture induite pendant 12h. **CS1** et **CS2** : contenu protéique après 1 cycle (CS1) ou 2 cycles (CS2) de purification par la technique d'ITC. À droite sont indiquées les masses moléculaires des protéines contenues dans le marqueur de taille PPPS (Biorad). Le gel a été coloré grâce à la technique « Stain-Free » de Biorad.

Un exemple de purification par ITC est donné dans la Figure 5. Des échantillons de lysats bactériens, de la fraction soluble (FS) ainsi que des surnageants de centrifugations à froid (CS) ont été analysés par SDS-PAGE. La fraction contenant les protéines solubles est composée d'une variété de protéines provenant d'*E. coli* (Host Cell Proteins, HCPs) et d'une protéine très abondante dont la masse

moléculaire comprise entre 30 et 37 kDa correspond à notre protéine d'intérêt (masse moléculaire théorique = 33,7 kDa).

Après la première centrifugation HS, les HCPs sont retrouvées majoritairement dans les surnageants alors que les ELPs sont très majoritairement récupérés dans le culot (résultat non montré). Lors de la première centrifugation CS, les ELPs solubles sont présents dans les surnageants. Une bande de forte intensité, toujours à la masse moléculaire attendue d'une trentaine de kDa, est visible alors que très peu de HCPs sont présentes dès la première étape de purification.

Lors du second cycle d'ITC (CS2), on observe que la bande protéique qui correspondrait à l'ELP M80 est toujours présente et dans des quantités bien supérieures (bande plus intense et plus large). Deux cycles d'ITC ont donc été suffisants pour purifier les ELPs M80 et M100 avec un degré suffisant de pureté alors qu'il faut généralement 4 à 5 cycles pour la plupart des ELPs (Hassouneh *et al*. 2010). La purification des ELPs Mx est notamment facilitée par leur hydrophobicité qui leur confère une valeur de Tcp basse.

Les ELPs de la série Mx ont été produits et les rendements de production obtenus sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

ELP	Mw théorique (kDa)	Rendement ELP purifié (mg/L culture)	
M20	8,7	28,7	
M40	17,4	83 +/- 15	n = 17
M60	25,4	103 +/- 25	n = 8
M80	33,7	116,5	
M100	42,6	47	

Tableau 1 : Rendements de production des différents ELPs de la série M après purification par la technique d'ITC.

Les expériences ont été répétées 2 fois pour les ELPs M20, M80 et M100, 17 fois pour l'ELP M40 et 8 fois pour l'ELPM60.

Les rendements de production des ELPs M40, M60 et M80 sont relativement semblables, autour de 100 mg/L culture. Ces valeurs de production sont tout à fait comparables à celles données dans la littérature (Chow *et al*. 2006) pour des ELPs de masses moléculaires similaires (15-30 kDa). En revanche, les rendements obtenus pour les ELPs M20 et M100 étaient nettement inférieurs, de 2 à 4 fois. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cela. En ce qui concerne l'ELP M20, le fait qu'il soit de petite taille (8,7 kDa) lui confère une Tcp relativement élevée et très dépendante de sa concentration. Ces deux facteurs combinés font qu'il est vraisemblablement difficile de récupérer tous les ELPs M20 produits lors de la première étape d'ITC. En ce qui concerne l'ELP M100, l'hypothèse est différente. Nous pensons en effet que la production de ce polypeptide, contenant 26 résidus méthionine, pose un problème métabolique aux cellules d'*E.coli*. En effet, la méthionine est un acide

aminé présent en faibles quantités dans les bactéries (Ferla & Patrick 2014), car son coût énergétique est relativement élevé (Akashi & Gojobori 2002). De plus, un seul ARN de transfert correspond à cet acide aminé. On peut donc imaginer que la production en grande quantité d'une protéine contenant des répétitions du pentapeptide VPGMG soit problématique, et qu'à partir d'un certain nombre de répétions les rendements de production baissent. Pour pallier ce problème, il pourrait être envisageable de supplémenter le milieu de culture en méthionine, ou encore d'ajouter un autre plasmide pour surexprimer l'ARN de transfert méthionine et la méthionine-RNA synthétase. Cette approche pourra être envisagée si, dans l'avenir, des ELPs de taille supérieure au M100 doivent être produits.

3.3. Caractérisation des ELPs.

Les ELPs M40 et M60 déjà produits (Dai *et al*. 2021) ainsi que les ELPs M80 et M100 ont été étudiés en vue de choisir lesquels possédaient les meilleures caractéristiques comme échafaudage pour des hydrogels.

3.3.1. *Gel d'électrophorèse en condition dénaturantes.*

Les ELPs M40, M60, M80 et M100 ont été analysés par électrophorèse dénaturante (Figure 6). On observe pour chaque polypeptide, une bande majoritaire correspondant à l'ELP d'intérêt, ce qui montre que la purification par ITC a été efficace. La masse moléculaire apparente mesurée pour chacun des ELPs concorde avec la masse moléculaire théorique.

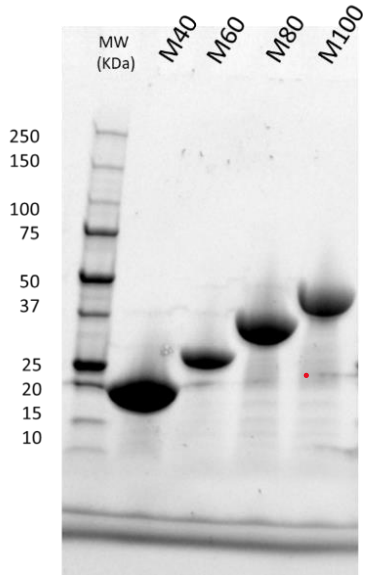


Figure 6 : Électrophorèse SDS-PAGE des ELPs de la série Mx.

Dix µg de chaque ELP M40, M60, M80 et M100 ont été déposés sur gel de polyacrylamide et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes. La révélation « stain-free® » des ELPs se fait grâce au composé trihalo présent dans le gel qui se lie de manière covalente aux résidus de tryptophane. MW théorique M40 = 17,4 kDa, M60 = 25,4 kDa, M80 = 33,7 kDa et M100 = 42,6 kDa.

3.3.2. *Caractérisation de l'ELP M80.*

L'ELP M80 recombinant a été caractérisé par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^{1}H), par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et par spectrométrie de masse (ESI-MS).

3.3.2.1. Caractérisation par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

La structure chimique de l'ELP M80 a été déterminée par RMN du proton. L'ELP M40 avait préalablement été caractérisé par RMN 1D et 2D (Petitdemange *et al*. 2017). L'attribution des pics de résonnance des protons a été effectuée en utilisant les résultats de ces travaux comme référence. Chaque proton de l'ELP M80 a été nommé par des lettres allant de « a » à « p » afin de mieux pouvoir les distinguer sur le spectre RMN ^{1}H (Figure 7).

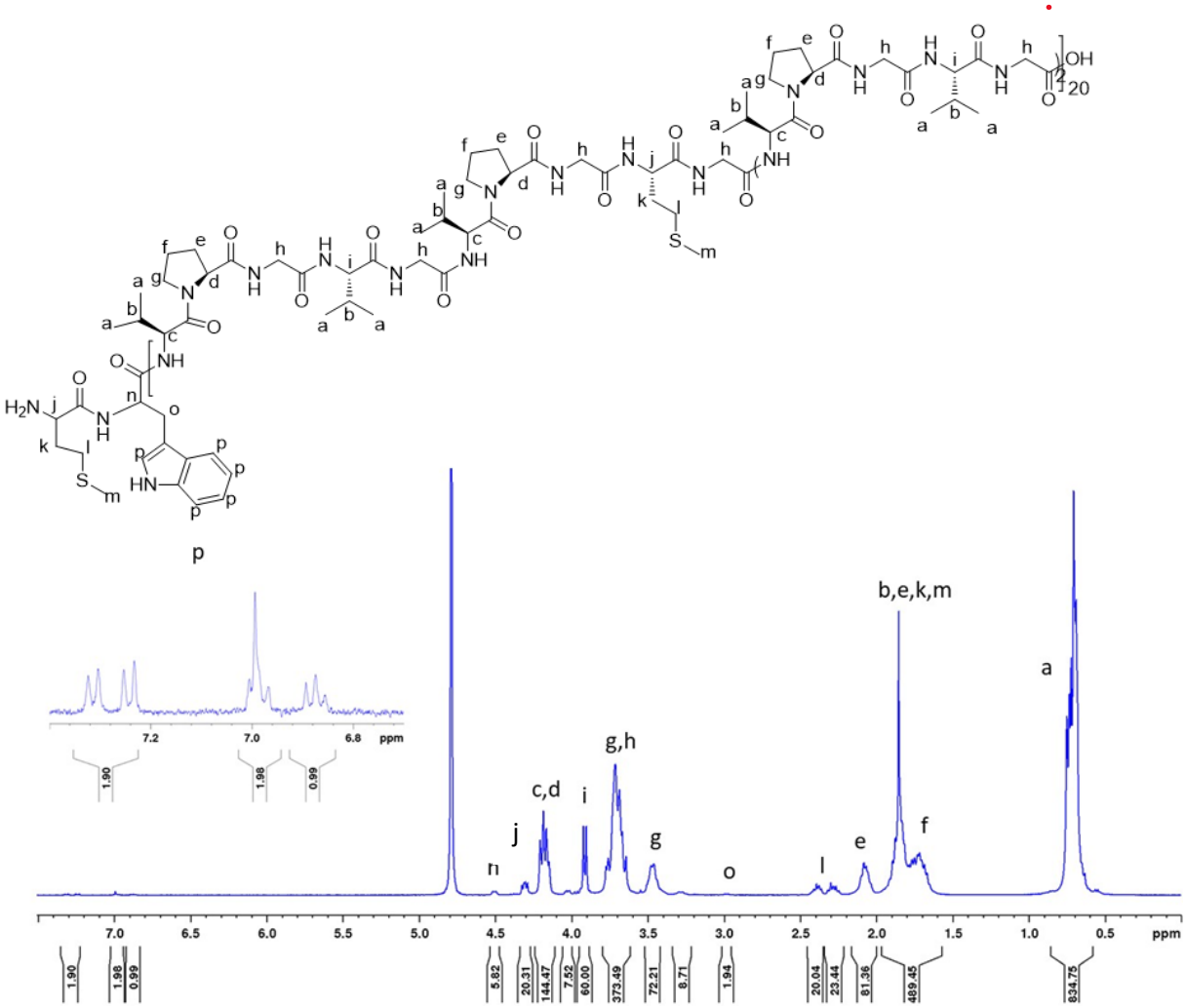


Figure 7 : Spectre RMN ^{1}H de l'ELP M80.

La position de chaque proton présent dans l'ELP M80 est indiquée par une lettre. L'ELP M80 a été dissous dans du D_20 à une concentration de 8 mg/mL. Le spectre a été calibré avec le pic du D_20 à 4,79 ppm et les intégrales ont été calibrées avec le pic du proton i pour 60 protons.

L'analyse en RMN ^{1}H de l'ELP M80 est présentée dans la Figure 7. Les pics de résonance des protons correspondent à ceux préalablement obtenus pour l'ELP M40 (Petitdemange *et al*. 2017), ces deux ELPs ayant la même structure globale et ne différant que par le nombre de répétitions. L'intégration des pics de résonance du spectre RMN s'est faite en prenant pour référence le proton « i » porté par le carbone α des résidus de valine correspondant à 60 protons. Ces protons ont été sélectionnés car leur pic de résonnance est bien isolé de ceux des autres protons. De plus, la valine ne subissant pas de modifications post-traductionnelles, les protons correspondants peuvent servir de standard pour quantifier les autres pics de résonance.

Comme précédemment expliqué, l'oxydation des résidus de méthionine en sulfoxide ou en sulfone peut se produire pendant les étapes de production et de purification si une température excessive est appliquée. Si une telle réaction se produit, cela se traduit par un déblindage des signaux « l » et « m », avec un déplacement du pic des protons « m » présent sur la méthionine à la position δ = 2,75 ppm dans le cas où la méthionine est oxydée en sulfoxide, ou à δ = 3,1 ppm si l'oxydation provoque l'apparition de sulfone (Petitdemange *et al*. 2017). Aucun de ces déplacements n'étant observé sur le spectre RMN, nous pouvons conclure que les méthionines de l'ELP M80 ne sont pas oxydées. Elles seront donc disponibles pour les modifications chimiques ultérieures visant à introduire des fonctions alcènes, étape préalable à la formation des hydrogels.

3.3.3.2 Analyse de l'ELP M80 par chromatographie d'exclusion stérique.

Le chromatogramme d'exclusion stérique (SEC) de l'ELP M80 est présenté dans la Figure 8 A. Un seul pic symétrique a été obtenu à un temps de rétention de 24,4 min, indiquant l'homogénéité de la population d'ELP et l'absence de quantités significatives de multimères. L'indice de polydispersité (Pdi), qui donne une idée de la distribution des masses molaires, est de 1,06. Ce résultat montre la monodispersité de la population d'ELP M80 (Lam & Chen 2019).

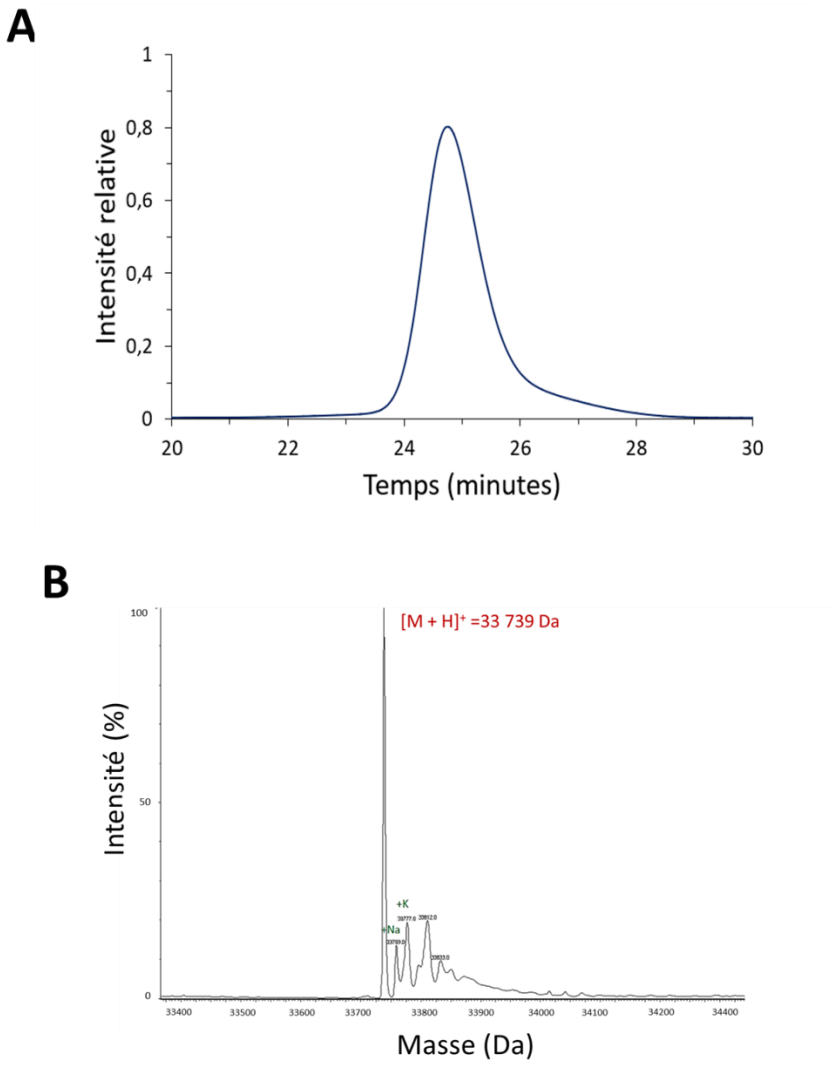


Figure 8 : Chromatogramme d'exclusion stérique (A), et spectre de masse ESI-MS de l'ELP M80 (B).

La dispersité des ELP a été vérifiée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans un solvant (AcOH 0,3M, AcONH4 0,2M et ACN) qui permet de séparer les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Le chromatogramme correspondant au temps d'élution est représenté (**A**). La masse moléculaire de l'ELP-M80 est de 33739 Da, elle a été obtenue par spectrométrie de masse ESI-MS par Kattel Bathany (CBMN, UMR 5248, Université de Bordeaux) (**B**).

La masse moléculaire de l'ELP M80 a été mesurée par spectrométrie de masse ESI-MS (Figure 8B). Un pic majeur correspondant à une masse moléculaire $[M+H]^+$ de 33739 Da a été détecté. Cette masse est proche de la masse moléculaire théorique qui est de 33736 Da.

Comme précédemment évoqué, la purification par ITC de l'ELP M80 nécessite l'ajout de sels afin de diminuer la Tcp et ainsi favoriser la précipitation des ELPs. Toutefois ces sels doivent ensuite être éliminés par dialyse afin qu'ils n'interfèrent pas avec les étapes de modifications chimiques. Pour vérifier que tous les sels avaient bien été éliminés des échantillons dialysés et lyophilisés, nous avons procédé à des analyses de thermogravimétrie (Figure 9).

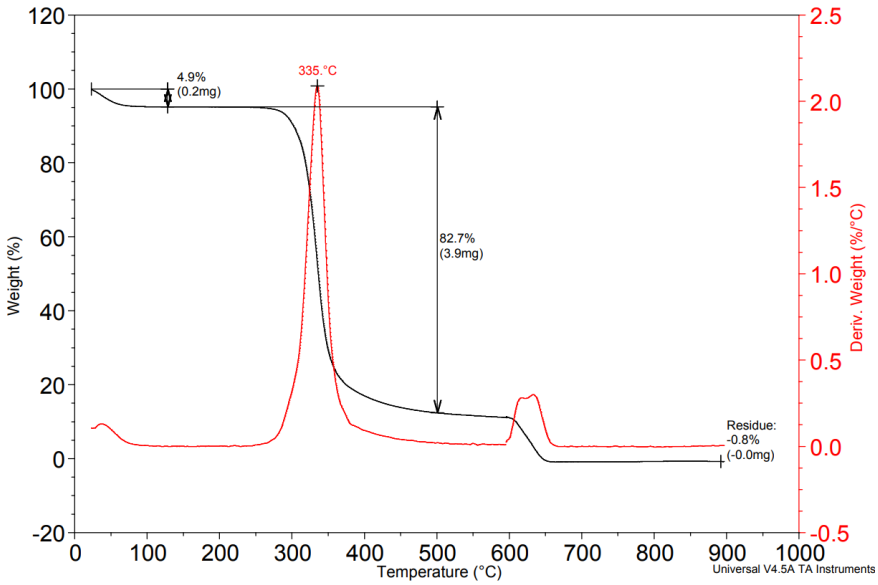


Figure 9 : Thermogramme de l'ELP M80.

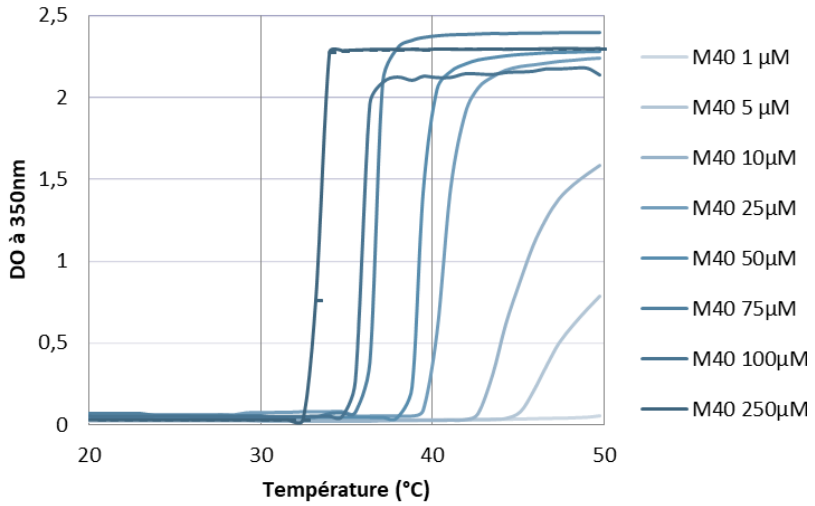
Evolution de la perte de masse de l'ELP M80 en fonction de la température. Suite à la pyrolyse, les composés organiques sont éliminés et seuls les résidus inorganiques sont conservés.

Le thermogramme (courbe noire sur la Figure 9) montre trois pertes de masses successives. La première correspond à la vaporisation de l'eau liée à l'ELP, qui représente environ 4,9 % de la masse initiale. S'ensuit une perte de masse de 82,7 % entre 230 et 600 °C qui correspond à la dégradation de la protéine sous atmosphère inerte. Au-delà de 600 °C, l'échantillon a été carbonisé avec de l'O_2 pour éliminer des résidus organiques, qui représentent 12,4 % de la masse initiale. À la fin de l'analyse, nous avons mesuré une masse de résidus inorganiques représentant -0,8 % de la masse initiale. Aux erreurs de mesure de masse près, cela indique que l'échantillon initial ne contient pas de quantités significatives de sels.

3.3.2.2. Mesure des points de trouble (TCPs).

Afin de déterminer les valeurs de Tcp, les mesures de turbidité en fonction de la température ont été effectuées à 350 nm avec un spectrophotomètre. La gamme de température étudiée variait de 20 à 55 °C. Les ELPs M40, M60, M80 et M100 ont été étudiés à différentes concentrations dans deux tampons différents (Tris 10 mM pH 8,0 et PBS 10 mM pH 7,4).

Alors que le tampon Tris 10 mM pH 8,0 ne contient pas de sels, le PBS 10 mM pH 7,4 (tampon phosphate salin) est une solution contenant du chlorure de sodium (0,137 M), du phosphate disodique (0,01 M), du phosphate monopotassique (0,0018 M) et du chlorure de potassium (0,0027 M). Sa composition est proche de celle du sérum physiologique. Un exemple représentatif des résultats obtenus est donné dans la Figure 10.



Concentration (µM)	1	5	10	25	50	75	100	250
Tcp (°C)	49,0	45,9	43,7	40,7	39,3	37,0	35,5	33,4

Figure 10 : Profils de turbidité de l'ELP M40 à différentes concentrations en tampon Tris 10 mM pH 8.

Comme attendu, on observe qu'en dessous d'une certaine température les ELPs M40 sont solubles. À partir d'une certaine température, qui varie en fonction de la concentration de l'échantillon, on observe une augmentation de la DO traduisant l'agrégation des ELPs. Pour toute la suite du manuscrit, nous avons défini la valeur de la Tcp comme étant le maximum de la dérivée des courbes DO=f(T). On observe également comme précédemment décrit par Chilkoti et ses collaborateurs (Meyer & Chilkoti 2004) que plus l'ELP M40 est concentré, plus la Tcp mesurée est basse.

Toutes les mesures de Tcp des ELPs M40, M60, M80 et M100 dans chacun des deux tampons ont ensuite été rassemblées dans des graphiques représentant la Tcp en fonction du logarithme de la concentration en ELPs (Figure 11). Chilkoti et ses collègues ont établi un modèle qui met en corrélation les valeurs de Tcp avec la composition, la concentration et la longueur de la chaîne des ELPs dans l'équation suivante (Meyer & Chilkoti 2004) :

$$Tcp = Tcpc + \frac{k}{L}\ln\left(\frac{Cc}{C}\right)$$

Dans cette équation, Ttc correspond à la température critique, k est une constante intrinsèque de la famille d'ELP (pour nous la série M), L est le nombre de répétitions du pentapeptide, Cc est la concentration critique ou LCST, et C est la concentration de l'échantillon. Cette équation permet de prédire la Tcp à une concentration donnée pour une séquence d'ELP donnée.

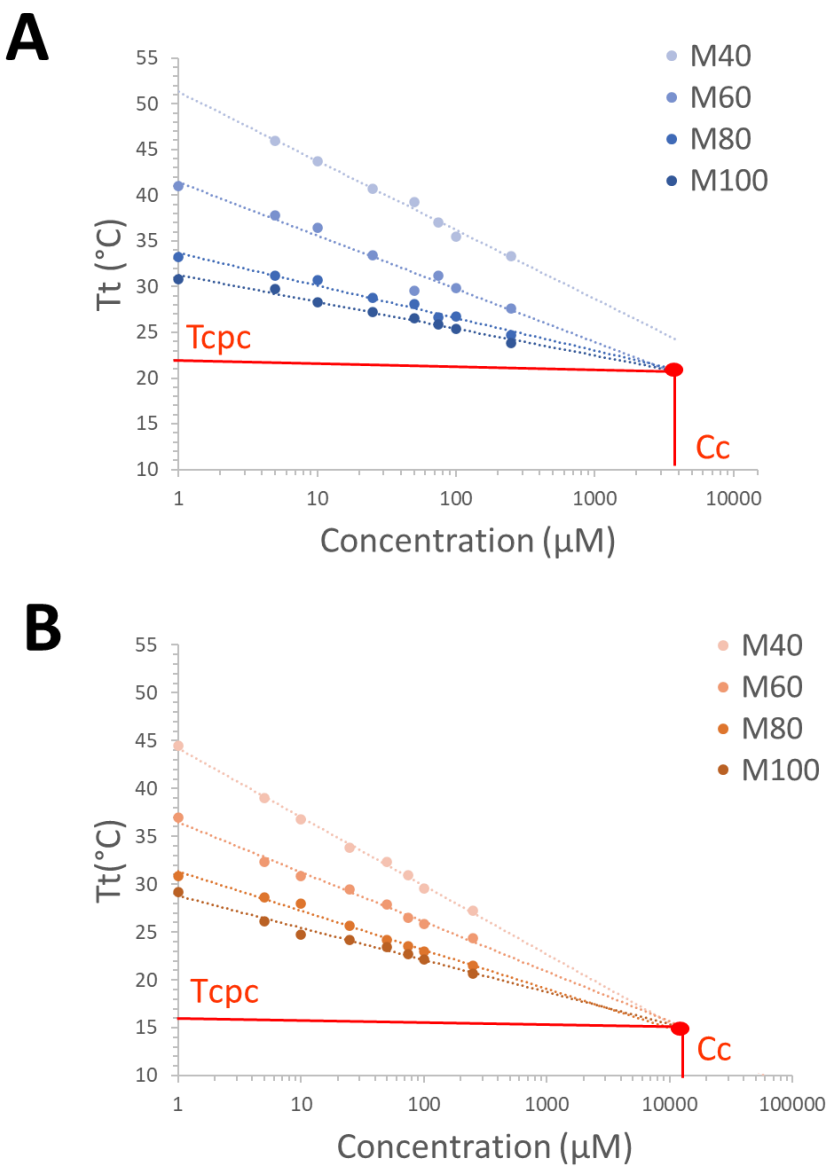


Figure 11 : Tcps des ELPs Mx en fonction de leur taille, de leur concentration et de la concentration en sels du milieu.

Les profils de turbidité des ELPs M20, M40, M60, M80 ont été mesurés à 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 et 250 µM dans un tampon Tris 10 mM pH 8 (**A**) et dans un tampon PBS 10 mM pH 7.4 (**B**). Les points Tcpc pour Température de transition critique et Cc pour Concentration critique sont indiqués.

Le graphique Figure 11A correspond aux mesures de Tcp des ELPs de la série M dans le tampon Tris. On remarque que plus la taille de l'ELP augmente, moins la valeur de Tcp dépend de sa concentration. Les droites des Tcps se croisent en un point dont les coordonnées donnent les valeurs de Tcpc en ordonnées et Cc en abscisses. Le point Tcpc correspond à environ 22 °C et la valeur Cc à environ 2,2 mM.

Les Tcps des ELPs M40, M60, M80 et M100 ont également été déterminées en tampon PBS (Figure 11B). Pour tous les ELPs, les valeurs de Tcp mesurées en tampon PBS sont plus faibles que celles obtenues en tampon Tris, ce qui indique que la Tcp est bien influencée par la teneur en sels comme

précédemment démontré (Meyer & Chilkoti 1999). On remarque également que les droites se croisent toutes en un même point de coordonnées Tcpc d'environ 16°C et de valeur de Cc de 12 mM.

Ces résultats confirment que la présence de sels dans la solution d'ELPs diminue la valeur des Tcps. On observe également que plus la taille de l'ELP augmente, moins la Tcp est dépendante de la concentration en polypeptide. Les droites obtenues pour les ELPs M80 et M100 sont très proches, et ce quel que soit le tampon utilisé. Ayant préalablement montré que les rendements de production et de purification de l'ELP M80 étaient 2 à 3 fois supérieurs à ceux de l'ELP M100, nous avons donc choisi d'utiliser l'ELP M80 comme polymère pour former les hydrogels.

La mise au point de la formulation de l'hydrogel nécessite une quantité de matériel ELPs importante. Nos capacités de production au LCPO étaient limitées à 6 litres de culture par semaine, soit environ 600 mg d'ELPs. N'ayant pas la possibilité matérielle d'augmenter ces capacités, nous avons transféré la production à la société TPNBT (Technical Proteins NanoBioTechnology), localisée à Valladolid en Espagne. Cette société a été fondée par le Pr. José Carlos Rodríguez Cabello, dont l'expertise dans le domaine des ELPs est mondialement reconnue (Srivastava *et al*. 2011).

La société TPNBT a produit l'ELP M80 dans un fermenteur de 100 L (Bioprocess®), et le protocole de purification a été réalisé en suivant nos préconisations. Tous les lots reçus ont été caractérisés de la même manière que ceux produits au LCPO.

IV. Post-modifications chimiques des ELPs.

Les hydrogels à base de polymères peuvent être formés par différents types de réticulation. Il s'agit de créer par réaction chimique des liaisons covalentes entre les monomères. Dans de plus rares cas, la réticulation s'effectue par assemblage supramoléculaire *via* des liaisons non covalentes. Suite aux connaissances développées au LCPO, nous avons choisi la stratégie de réticulation covalente, et plus particulièrement la chimie de réaction d'addition thiol-ène. Cette réaction nécessite d'une part des chaînes possédant des groupes alcènes, et d'autre part des chaînes présentant des groupes thiols. En présence de photo-initiateur et sous rayonnement UV, ces groupes vont former une liaison covalente.

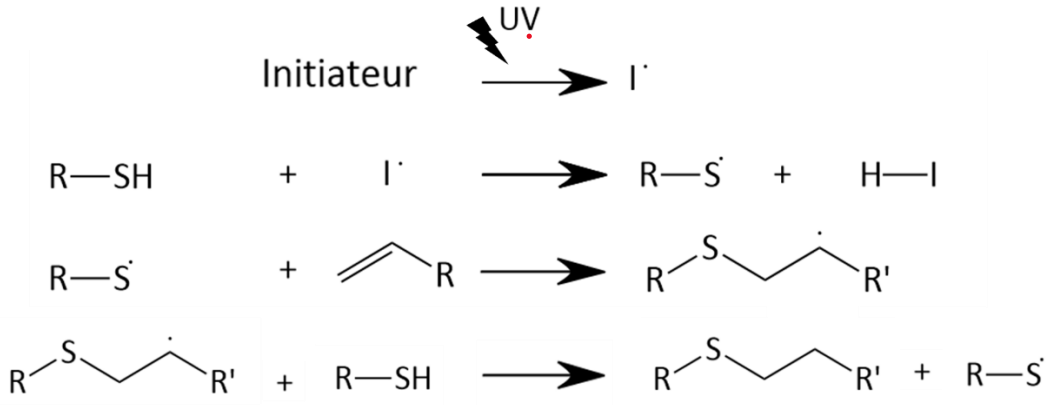


Figure 12 : Schéma de la réaction thiol-ène catalysée par un photo-initiateur sous UV.

La réaction d'addition thiol-ène fait partie des réactions dites de « click chemistry » qui offrent un rendement élevé, une bonne stéréosélectivité, et une vitesse de réaction rapide. Cette réaction nécessite une première étape (i) de photo-activation d'un initiateur grâce à la lumière UV dans notre cas, (ii) formation d'un initiateur radicalaire. Transfert du radical au souffre et (iii) formation d'une liaison covalente thioéther. Schéma adapté de Carlborg *et al.*, 2011.

Les ELPs ont été modifiés chimiquement en greffant des groupes alcènes sur les méthionines. La technique qui a permis d'obtenir ces ELP-alcènes est une réaction dite de « thioalkylation » telle que décrite dans le paragraphe suivant.

4.1. Addition d'un groupe alcène sur les méthionines de l'ELP M80 par réaction de thioalkylation.

Parmi les acides aminés naturels, la méthionine est un résidu intéressant en raison de la réactivité particulière de son groupe thioéther. En effet, la chaîne latérale de la méthionine sera la plus nucléophile en conditions acides, l'amine N-terminale de la chaîne polypeptidique étant sous forme d'ammonium (NH_3^+). Par conséquent, la chaîne latérale méthionine peut être soumise à des réactions d'alkylation très efficaces, conduisant à des dérivés stables, sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des groupements protecteurs.

La modification chimiosélective de la chaîne latérale de la méthionine dans les polypeptides de type élastine implique une addition nucléophile. Le composé allylglycidyl éther contient une fonction époxyde hautement réactive, et cette dernière va être attaquée par l'un des doublets non liant de l'atome de soufre des résidus méthionines. Le cycle époxyde extrêmement contraint va s'ouvrir et s'additionner au soufre, le transformant en groupement sulfonium. La charge positive du sulfonium est ensuite stabilisée par la forme déprotonée de l'acide acétique (chargée négativement), acide qui est utilisé comme solvant de réaction.

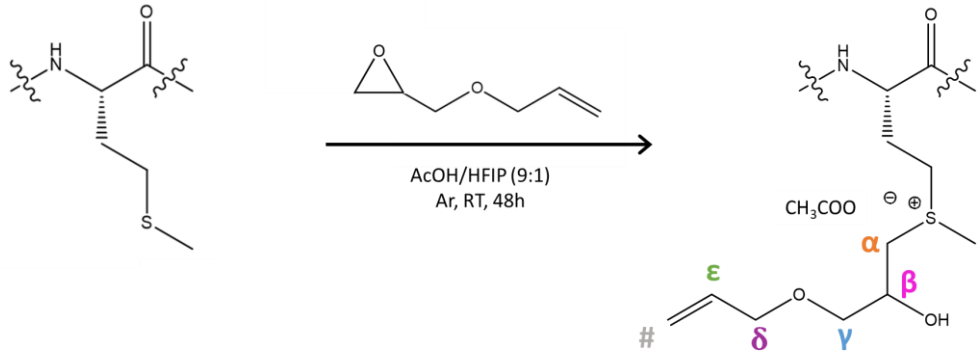


Figure 13 : Réaction de thioalkylation de la méthionine composant les ELP de la série M, adapté de Petitdemange *et al.* 2017.

La réaction de thioalkylation des ELPs M80 en ELPs M80-alcène se fait pendant 48h à température ambiante. Les ELPs M80 ont été dissous dans un mélange acide acétique / hexafluoroisopropanol (9:1, v/v), sous Argon. Du 1-allyloxy-2,3-époxypropane a été ajouté en 3 fois (0 h, 24 h et 36 h après le lancement de la réaction), avec 10 équivalents par résidu de méthionine.

Plus en détail, l'ELP d'intérêt est dissous dans un mélange composé à 90 % d'acide acétique et à 10 % d'HFIP, qui améliore l'accessibilité à la chaîne latérale de la méthionine. Une fois l'ELP dissous, de l'allylglycidyl éther contenant la fonction époxyde est ajouté en trois fois et en très large excès (10 équivalents/méthionine) dans le but d'introduire la fonction alcène. Comme les résidus de méthionine des ELPs sont moins réactifs que ceux de la poly(L-méthionine) (Deming 2017), les époxydes ont été utilisés en excès et ajoutés en 3 fois pour limiter leur hydrolyse.

La réaction totale de thioalkylation se fait pendant 48 h à température ambiante sous atmosphère inerte (argon). La mise sous argon permet d'éviter la réaction secondaire d'oxydation du thioéther par l'oxygène.

Le spectre RMN du proton de l'ELP M80 fonctionnalisé avec un alcène est représenté dans la Figure 14. On observe la présence de l'intégralité des protons de l'ELP M80, ainsi que les protons nommés « α, β, γ, δ, ε et # » apportés par la réaction de thioalkylation. Le degré de fonctionnalisation a été déterminé par intégration du pic de résonance des protons méthyle Met (-SCH_3) par rapport au pic de

résonance des protons asymétriques de la valine (position du résidu invité X, signal i) intégrant pour 60 ^{1}H. Ce spectre montre que moins d'un méthyle (-SCH_3) (à 3,04 ppm dans l'ELP non modifié) est présent au déplacement chimique de 2,8 ppm correspondant au soufre oxydé en sulfoxide (-S=O(CH_3)). La calibration avec le proton « i » permet d'obtenir les intégrales de tous les protons des polypeptides.

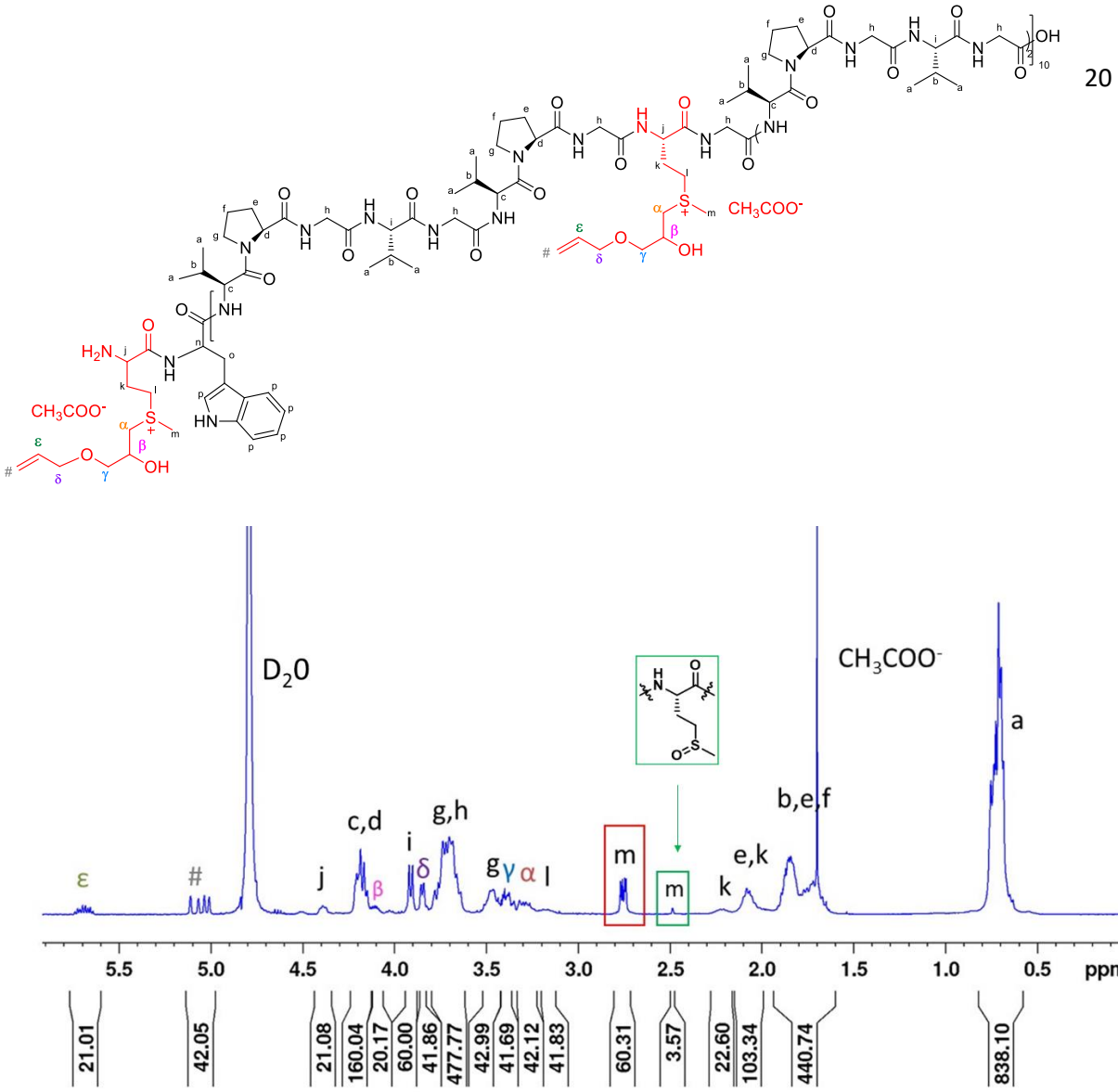


Figure 14 : Spectre de RMN du proton de l'ELP M80-alcène.

L'ELP a été dissous à une concentration de 8 mg/mL dans du D_2O. L'expérience a été menée à une température de 298 K sur un appareil Bruker AVANCE III HD 400. Les principaux pics de l'ELP-M80 thioalkylé sont au niveau des déplacements chimiques (en ppm) : 6,01-5,91 (22 H, CH alcène, signal ε), 5,37-5,27 (44 H, CH_2 alcène, signal #), 4,64 −4,62 (22 H, CHα Met, signal j), 4,47−4,40 (160 H, CHα Val and Pro, VPGXG, signal c et d), 4,37-4,35 (22 H, CHOH Met, signal β), 4,18-4,16 (60 H, CHα Val, VPGVG, signal i), 4,11-4,10 (44 H, CH_2 Met, signal δ), 3,02-2,99 (66 H, SCH_3 Met, signal m), 1,00−0,93 (940 H, CH_3 Val, signal a). L'encadré vert correspond à la méthionine oxydée en sulfone.

On observe également le pic du contre ion (CH_3COO^-) qui vient stabiliser l'ELP chimiquement modifié.

Au total, 9075,6 mg d'ELP M80 ont été modifiés et 7913,6 mg ont été récupérés après purification. Le rendement de production moyen était de 87 %, avec 20 méthionines fonctionnalisées sur 21 pour tous les lots.

La Tcp des ELP M80-alcène a été mesurée par turbidimétrie (Figure 15). Nous avons précédemment déterminé la Tcp de l'ELP M80 qui était de 27,3°C (100 µM en tampon PBS). Après la réaction de thioalkylation, nous n'avons pas observé de Tcp dans la gamme de température étudiée. Ceci peut s'expliquer par l'introduction de charges positives le long de la chaîne polypeptidique qui empêchent l'aggrégation des polypeptides modifiés (Petitdemange *et al*. 2017).

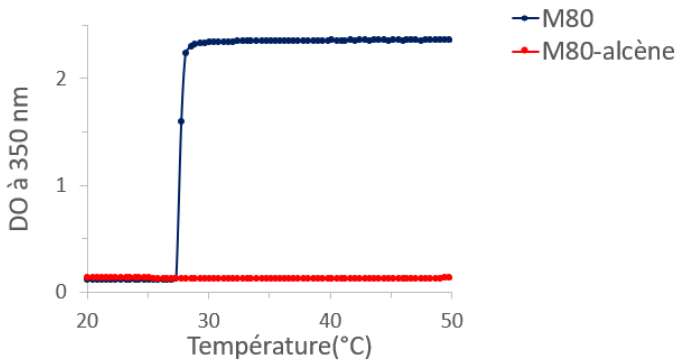


Figure 15 : Profil de turbidité des ELPs M80 et M80-alcène.

La thermosensibilité des ELPs est mise en évidence grâce à leur absorbance à 350 nm, en faisant varier la température de 15 à 50 °C avec un incrément de 1 °C/min. Les ELPs ont été dissous dans un tampon PBS à une concentration de 100 µM.

4.2. Élimination du groupe méthyle de l'ELP M80-alcène par réaction de déméthylation.

Les mesures de turbidité de l'ELP M80 après réaction de thioalkylation ont montré la perte de thermo-sensibilité, ce qui n'était pas souhaité dans le cadre de notre étude. En effet, la coacervation des ELPs pouvait être un élément intéressant pour moduler les caractéristiques rhéologiques de l'hydrogel en fonction de la température. Nous avons donc décidé de déméthyler les groupements sulfonium pour retrouver une fonction thioéther plus hydrophobe, et donc restaurer les propriétés de thermosensibilité des ELPs. La réaction de déméthylation avait été préalablement établie par le Dr. Petitdemange (Petitdemange *et al*. 2017) et optimisée par le Dr. Rosselin (Rosselin *et al*. 2019).

Nous avons déméthylé les groupes sulfonium de l'ELP M80-alcène en utilisant du pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (APDC) dans de l'éthanol à 75 % (5 équivalents/méthionine). Cette réaction ayant pour but de créer des résidus de S-alkyl-L-homocystéine a été développée par le Professeur Timothy Deming (Deming 2017) et a été adaptée aux ELPs (Figure 16).

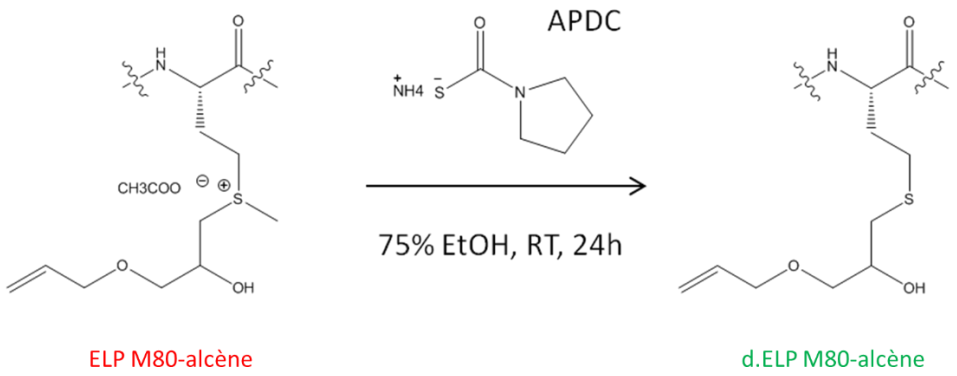


Figure 16 : Réaction de déméthylation de la méthionine, adapté de Rosselin *et al.*, 2019.

L'ELP M80-alcène a été dissous dans une solution à 75 % d'EtOH, puis du pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (APDC) a été ajouté avec 5 équivalents par résidu méthionine. La solution a été agitée sous Argon pendant 24 h et à température ambiante.

Après réaction, l'ELP-alcène déméthylé (d.ELP-alcène) a été dialysé et lyophilisé. Nous avons obtenu un rendement de réaction de 68,3 %, en amélioration par rapport à celui publié en 2019 par Rosselin et collaborateurs (44 %).

4.3. Caractérisation de l'ELP M80 déméthylé.

Le d.ELP M80-alcène a été analysé par électrophorèse SDS-PAGE et par RMN du proton. Sa Tcp a été évaluée par turbidimétrie à 350 nm.

4.3.1. *SDS-PAGE.*

Les ELPs M80, M80-alcène et d.M80-alcène ont été analysés par SDS-PAGE (Figure 17). On observe une très légère augmentation de la masse moléculaire apparente des ELPs M80-alcène et d.M80-alcène, d'environ 2 kDa par rapport à l'ELP M80 non modifié. Ceci suggère que la réaction d'alkylation s'est bien déroulée.

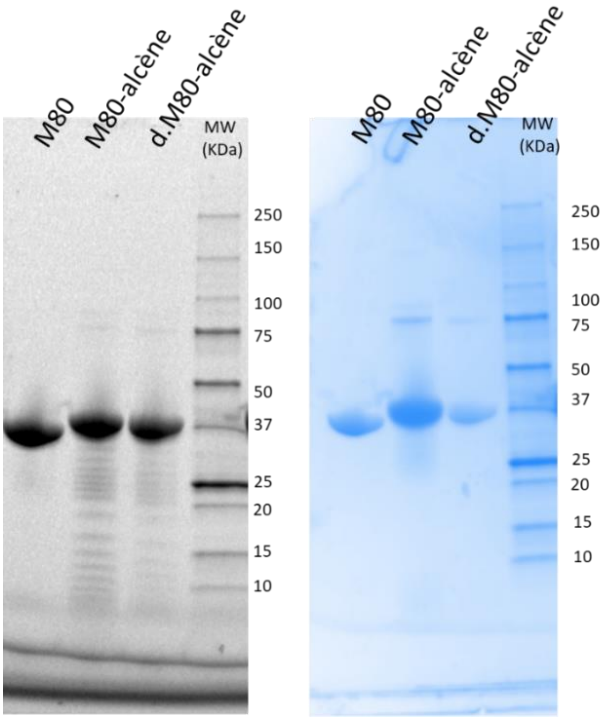


Figure 17 : Electrophorèse SDS-PAGE des ELPs M80, M80-alcène et d.M80-alcène.

10 µg de chaque ELP ont été déposés par piste. Après une révélation *stain free* (image de gauche), le même gel a été coloré avec du bleu de Coomassie colloïdal InstantBlue™ (image de droite).

Dans les pistes M80-alcène et d.M80-alcène, d'autres bandes sont visibles à des masses moléculaires plus élevées. Elles pourraient correspondre à des formes dimériques. Ce gel d'éléctrophorèse étant réalisé en présence de détergent (SDS), ces formes dimériques pourraient être dues à la formation de liaison covalentes intermoléculaires dont nous n'avons pas identifié la nature à ce jour. Toutefois, ces dimères ne représentant qu'une population mineure de l'échantillon (< 5 %), nous n'avons pas cherché à les éliminer. D'autres bandes de faibles intensités correspondant à des polypeptides de masses moléculaires inférieures à celle du monomère sont également observées. Elles pourraient correspondre à des produits de dégradation de l'ELP M80 suite aux réactions chimiques, car elles sont quasiment absentes de l'ELP M80 de départ.

L'ELP d.M80-alcène (Figure 17, piste 3) a globalement le même profil de migration que celui de l'ELP M80-alcène. La bande majoritaire, correspondant au monomère, migre toutefois légèrement plus bas, ce qui pourrait traduire la perte des groupements méthyles. Des formes dimériques et des produits de dégradation sont encore observés dans l'échantillon déméthylé.

4.3.2. *RMN ^{1}H.*

Les différents ELPs ont été analysés par RMN du proton, et les spectres correspondants sont présentés dans la Figure 18. Le spectre de l'ELP M80 sert de référence. Les protons des alcènes sont entourés et observables à des déplacements chimiques compris entre 5,2 et 6 ppm. Ces pics caractéristiques sont absents de l'ELP M80 avant modification, présents sur le spectre de l'ELP M80-alcène, et sont conservés pour l'ELP d.M80-alcène. Ces résultats permettent de confirmer l'addition des groupes alcènes sur les résidus de méthionine.

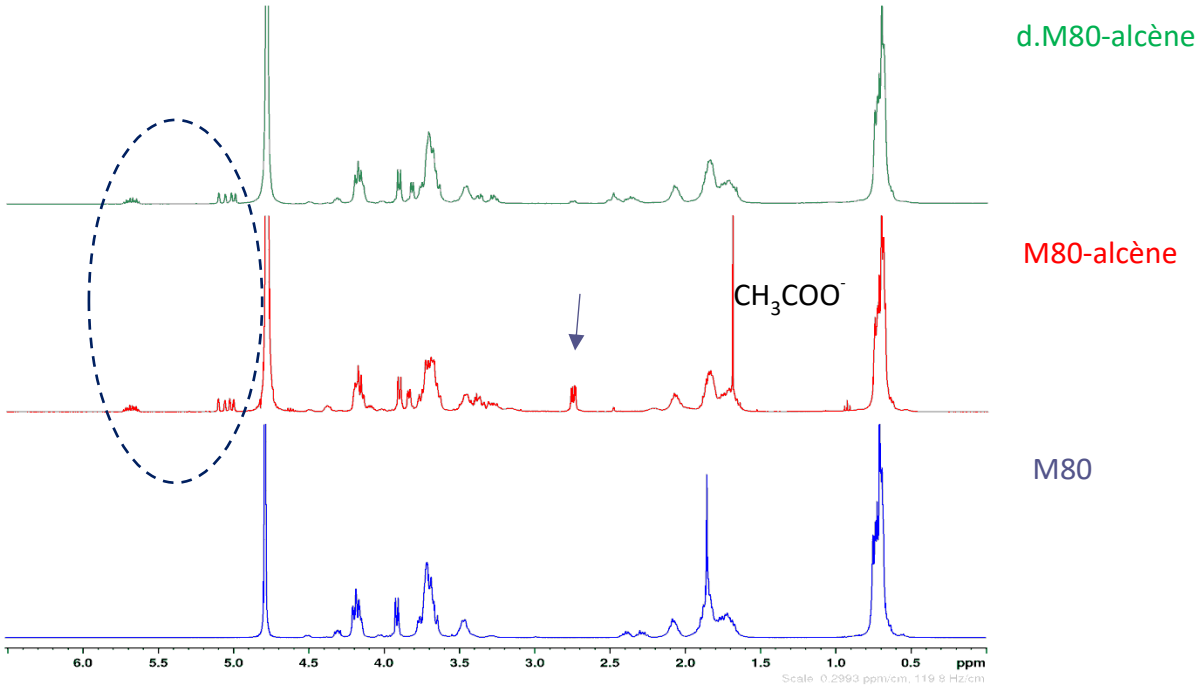


Figure 18 : Spectre RMN du proton des ELPs M80, M80 thioalkylé (M80-alcène) puis déméthylé (d.M80-alcène).

Les ELPs ont été dissous à une concentration de 8 mg/mL dans du D_2O. L'expérience a été menée à une température de 298 K sur un appareil Bruker AVANCE III HD 400. Les pics des alcènes introduits par la réaction de thioalkylation pour former l'ELP M80-alcène sont au niveau des déplacements chimiques (en ppm) : 6,01-5,91 (22 H, CH alcène, signal ε) et 5,37-5,27 (44 H, CH_2 alcène, signal #) retrouvés dans l'encadré. Le pic du méthyle à δ = 2,75 est représenté par une flèche. Le pic du contre-ion est indiqué (CH_3COO^-).

Après thioalkylation on observe l'apparition d'un nouveau pic à δ = 2,75 ppm. Ce pic étant absent du spectre de l'ELP M80, sa détection dans l'échantillon M80-alcène confirme que la réaction a bien eu lieu. Après la réaction de déméthylation visant à supprimer ce méthyle, nous observons que le pic à 2,75 ppm a bien disparu du spectre de l'ELP d.M80-alcène. Ceci est également confirmé par la disparition du pic du contre-ion. Ces résultats confirment que les réactions de thioalkylation puis de déméthylation sont quasiment quantitatives, que l'un des résidus méthionine étant oxydée n'a pas été alkylé, et que les structures chimiques de chaque ELP sont conformes aux attentes.

4.3.3. *Détermination de la Tcp des ELPs d.M80-alcène.*

L'objectif de la déméthylation des ELP-alcènes était de restaurer le caractère thermosensible.

Les profils de turbidité sont présentés dans la Figure 19. Une Tcp de 27,3°C a été mesurée pour l'ELP M80. Après thioalkylation, nous ne détectons plus d'agrégation de l'ELP modifié dans la gamme de température étudiée. En revanche, la déméthylation de l'ELP d.M80-alcène permet de retrouver une Tcp de 26,1°C, proche de celle de l'ELP M80 à la même concentration de 100 µM. On aurait pu s'attendre à ce que la Tcp de l'ELP d.M80-alcène soit plus élevée puisque celui-ci est plus hydrophile que l'ELP M80 à cause des 20 fonctions supplémentaires, hydroxyle et éther, apportées par la réaction de thioalkylation. Toutefois, l'augmentation de la masse moléculaire ayant un effet inverse (diminution de la Tcp d'un ELP), cela peut finalement expliquer pourquoi les ELPs d.M80-alcène et M80 ont des Tcp équivalentes. Notre objectif de restaurer la propriété de thermosensibilité des ELPs alkylés a donc été atteint.

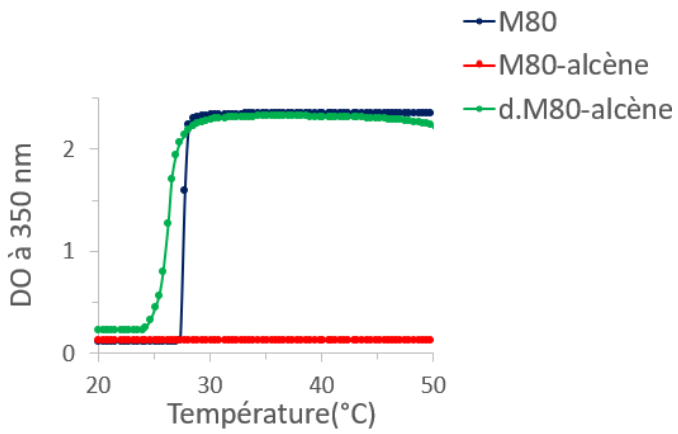


Figure 19 : Profil de turbidité des ELPs M80, M80-alcène et d.M80-alcène.

Les ELPs M80, M80-alcène et d.M80-alcène ont été préparés à 100 µM dans un tampon Tris 10 mM pH 8. La turbidimétrie a été analysée avec un spectrophotomètre à 350 nm dans une gamme de température de 20 à 50 °C.

V. Conclusion.

Dans ce premier chapitre, nous avons construit un clone correspondant à la séquence de l'ELP M80, puis produit ce polypeptide par voie recombinante chez la bactérie *E. coli*.

L'ELP M80 recombinant a été caractérisé par différentes techniques. L'analyse par SDS-PAGE a montré qu'il n'y avait pas de contamination importante par d'autres protéines, ce qui montre que la méthode de purification par ITC est simple et efficace. La masse moléculaire de 33739 Da a été déterminée grâce à une analyse par spectrométrie de masse ESI-MS. Comme attendu pour une production recombinante, la chromatographie d'exclusion stérique a montré une faible polydispersité du polypeptide, avec un Pdi de 1,07. La spectrométrie de résonnance magnétique du proton a permis de mettre en évidence la conformité de la structure de l'ELP, avec la présence de tous les protons attendus ainsi que l'absence d'oxydation des résidus de méthionine. L'analyse par thermogravimétrie a montré l'absence de composés inorganiques (sels) dans les ELPs purifiés. Finalement, les mesures de turbidité ont permis de mesurer une Tcp de 27,3 °C à 100 µM en tampon Tris.

L'ELP M80 a ensuite été modifié de manière chimio-sélective par l'insertion de groupes alcènes sur les résidus de méthionine. Le rendement de réaction était de 87 %, et 20 méthionines sur 21 ont été fonctionnalisées avec des groupes alcènes. Ces modifications chimiques ont conduit à des groupements sulfonium dans la structure de l'ELP, ce qui s'est traduit par une perte de la thermosensibilité.

Pour résoudre ce problème, les ELPs M80-alcène ont été déméthylés. Les analyses RMN ont confirmé l'élimination des groupements méthyl des fonctions, et des contre-ions CH_3COO^-. Les analyses de turbidimétrie ont permis de montrer qu'après déméthylation, le d.ELP M80-alcène retrouvait une Tcp proche de celle de l'ELP M80 non modifié.

À ce stade des travaux, trois ELPs différents ont été produits : l'ELP M80, l'ELP M80-alcène et le d.ELP M80-alcène. Les ELPs fonctionnalisés avec des groupements alcènes, soit l'ELP M80-alcène et le d.ELP M80-alcène, ont été sélectionnés pour servir de constituants dans le développement des hydrogels qui fera l'objet du chapitre suivant.

VI. Annexes.

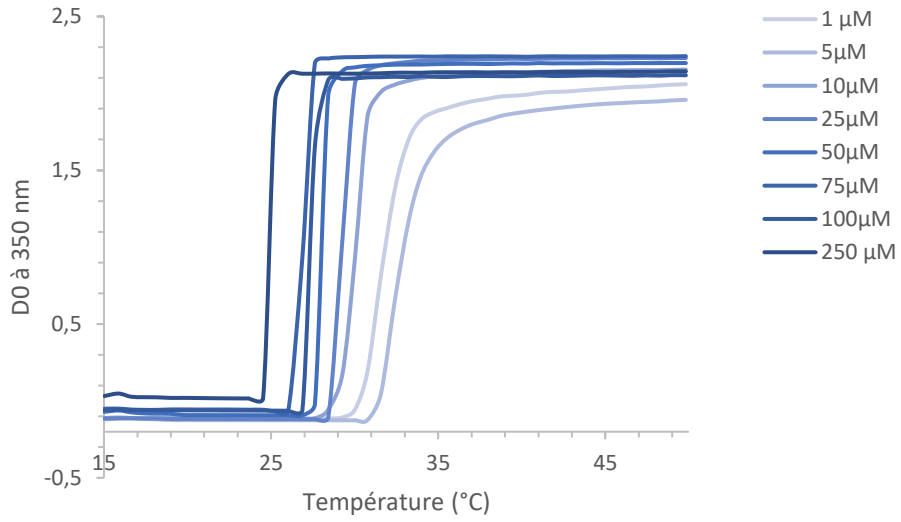


Figure S1 : Caractérisation de la turbidimétrie de l'ELP M80.

Une gamme de concentration allant de 1 µM à 250 µM a été réalisée dans un tampon Tris 10 mM pH 8.

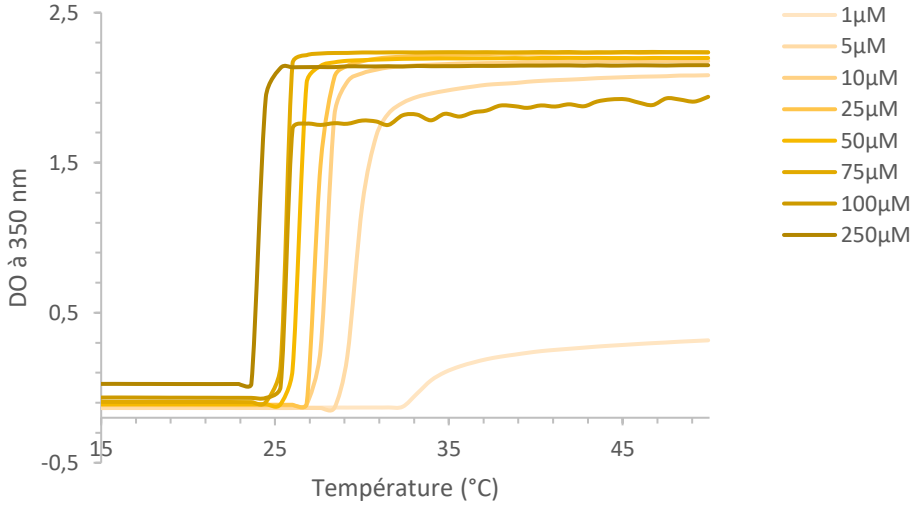


Figure S2 : Caractérisation de la turbidimétrie de l'ELP M100.

Une gamme de concentration allant de 1 µM à 250 µM a été réalisée dans un tampon Tris 10 mM pH 8.

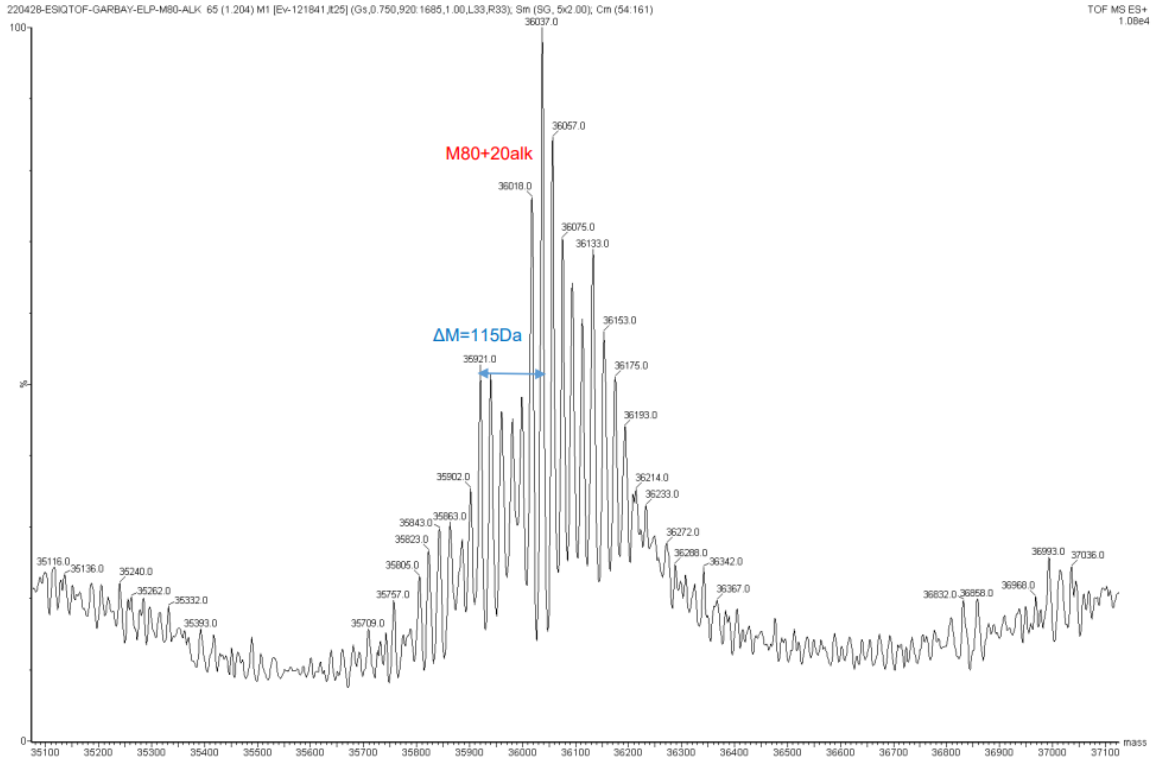


Figure S3 : Spectre de masse ESI-MS de l'ELP M80-alcène.

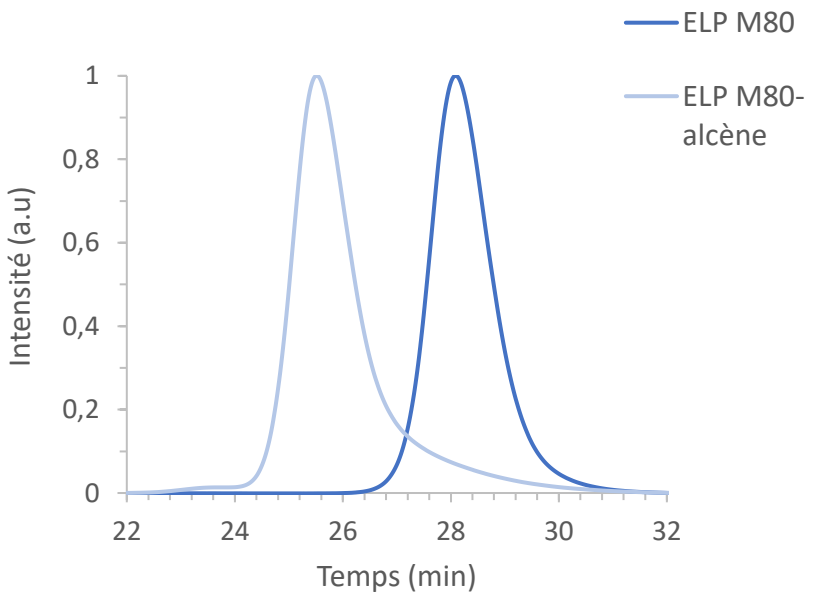


Figure S4 : Chromatogrammes d'exclusion stérique de l'ELP M80 et de l'ELP M80-alcène.

Chapitre 2 :

Production et caractérisation des matrices à base d'ELPs.

I. Introduction.

Les lésions osseuses sont des pathologies fréquentes dont la réparation peut être problématique, notamment dans le cas des fractures de taille critique. Les autogreffes et les allogreffes osseuses constituent alors les principales stratégies de réparation, mais l'accès aux greffons autologues est souvent limité, et il existe des risques immunologiques liés aux allogreffes. Pour pallier ces problèmes, nous avons souhaité développer une matrice de type hydrogel, dépourvue de cellules et de facteurs de croissance, pour régénérer un tissu osseux innervé et vascularisé. Cette matrice doit être biocompatible, poreuse et biodégradable (Marrella *et al*. 2018). En outre, il est également important que le biomatériau mime au mieux la matrice extracellulaire (MEC). En effet, la MEC osseuse est une matrice très poreuse qui fournit un microenvironnement tridimensionnel (3D) nécessaire à l'adhésion, à la prolifération et à la migration des cellules. Ces phénomènes ne peuvent se produire que dans un environnement interconnecté permettant l'échange des molécules nutritives et des facteurs de signalisation (Li *et al*. 2001; Tibbitt & Anseth 2009).

L'utilisation d'hydrogels pour l'ingénierie des tissus osseux est un choix intéressant car il est possible de moduler leur porosité par différentes techniques telles que le « *solvent casting* », la lyophilisation, le moussage de gaz ou l'électrofilage (Annabi *et al*. 2010). Les hydrogels sont constitués d'un réseau de chaînes de polymères hydrophiles. Lorsque les chaînes de polymères sont maintenues entre elles par des liaisons covalentes créées par réaction chimique, elles peuvent former un microenvironnement 3D. On obtient alors des réseaux très absorbants qui, en raison de leur importante teneur en eau, possèdent un degré de flexibilité très similaire à celui des tissus naturels (Annabi *et al*. 2010; Lee & Mooney 2001). Par ailleurs, les hydrogels sont généralement biocompatibles, peu inflammatoires, et peuvent être fonctionnalisés (Park 2011).

Plusieurs études se sont intéressées au développement d'implants à base d'hydrogels pour favoriser la régénération osseuse. Ces stratégies sont en général basées sur l'utilisation d'un hydrogel supplémenté soit avec des cellules, soit avec des facteurs de croissance, voire avec les deux combinés (Gaihre *et al*. 2021; García *et al*. 2016; Hasani-Sadrabadi *et al*. 2020; Rohman *et al*. 2019). Malgré des résultats prometteurs, ces deux approches comportent certaines limites comme une règlementation complexe sur l'utilisation des cellules autologues en ingénierie tissulaire, ou encore une libération incontrôlée des facteurs de croissance utilisés le plus souvent à des concentrations non physiologiques. Ainsi, l'utilisation de matrices sans cellules et sans facteurs de croissance pourrait être une alternative plus simple pour pallier ces complications, pour simplifier l'approbation par les autorités sanitaires, et pour obtenir un produit prêt à l'emploi (Zigdon-Giladi *et al*. 2015).

À l'heure actuelle, la plupart des biomatériaux osseux disponibles ont pour objectif de stimuler la formation osseuse, mais peu d'entre eux induisent une vascularisation et une innervation suffisante, ce qui entraîne un manque d'intégration des réseaux neurovasculaires après implantation. La conséquence est le plus souvent un échec de la réparation (Marrella *et al*. 2018). Dans ce contexte, notre équipe avait déjà travaillé sur l'utilisation de peptides de type élastine (ELP) pour produire des hydrogels. Les ELPs sont des biopolymères recombinants prometteurs pour certaines applications biomédicales. Ce sont des polypeptides dérivés de l'élastine qui peuvent être modifiés chimiquement à des fins de réticulation. Une stratégie courante pour induire une fonctionnalisation biologique de ces ELPs consiste à les combiner avec des peptides biomimétiques pour permettre, par exemple, le recrutement de certains types cellulaires, la dégradation de la matrice ou la fixation de certains minéraux.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'utiliser (i) les polypeptides de type élastine ELP M80-alcène obtenus dans le Chapitre 1, (ii) deux peptides d'adhésion dérivés de la laminine (IKVAV et YIGSR) pour augmenter le recrutement des cellules neuronales et vasculaires, (iii) un site protéolytique PVGLIG pour faciliter la dégradation de la matrice par les enzymes MMP2 et favoriser la migration cellulaire, (iv) des particules d'hydroxyapatite (HA), et (v) le peptide SNA15 qui permet la nucléation du phosphate de calcium (Raj *et al*. 1992) et donc d'obtenir une distribution homogène des particules de HA dans l'hydrogel.

Les objectifs de ce Chapitre 2 ont été les suivants :

- Déterminer la formulation optimale en termes de concentration en polymère et de rapport molaire entre les peptides bioactifs et l'ELP M80 fonctionnalisé.
- Optimiser le temps d'irradiation UV pour obtenir un hydrogel.
- Obtenir un hydrogel ayant une porosité suffisante et des pores interconnectés pour générer un environnement favorable aux échanges de nutriments et d'oxygène, et ainsi favoriser la colonisation cellulaire.
- Mettre en évidence l'importance du peptide SNA15 dans la rétention et la répartition des particules de phosphate de calcium à l'intérieur de la matrice.

II. Matériels et méthodes.

2.1. Préparation et analyse des particules d'hydroxyapatite (HA).

2.1.1. Synthèse de l'HA.

L'hydroxyapatite a été préparée par précipitation chimique humide (Fricain *et al*. 2013). La réaction se fait à 40°C. Brièvement, de l'acide phosphorique (85 %, Sigma® #W290017-1KG-K) a été ajouté goutte à goutte à une solution d'hydroxyde de calcium (96 %, Sigma® #31219-1kg) préalablement préparée. Le pH est maintenu supérieur à 9 avec de l'ammoniaque (28 %, VWR® #21 190.292). Après 10 h de repos, 2 phases apparaissent et le surnageant est éliminé. Trois lavages à l'eau milliQ (centrifugation 4000 rpm 20°C, 4 min) ont été réalisés, suivis d'une congélation à -80°C pendant 1 h et d'une lyophilisation. Le bloc obtenu a été cassé à l'aide d'un mortier et tamisé à 200 µm pour obtenir une poudre d'HA. Les concentrations des différentes solutions d'HA ont été déterminées après lyophilisation.

2.1.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR).

L'hydroxyapatite a été analysée par Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR). Les spectres ont été enregistrés à température ambiante sur un instrument Bruker® VERTEX 70 (résolution 4cm^{-1}, 64 balayages, DLaTGS MIR) équipé d'un modèle Pike GladiATR (cristal de diamant) pour la réflectance totale atténuée (ATR).

2.1.3. Analyse par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS).

La taille des particules d'HA avant filtration a été mesurée par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) sur un appareil Vasco™ Flex (Cordouan Technologies™). La taille des particules après filtration a été calculée à l'aide de l'appareil Nano–ZS90 (Malvern®). Cette technique non destructive permet d'accéder à la taille de particules en suspension. 300 µL de chaque échantillon ont été déposés dans une microcuvette, et les résultats ont été analysés avec le logiciel ZetaSizer®. Le diamètre moyen et la polydispersité (PDI) ont été moyennés, l'écart-type a été calculé à partir des statistiques des différentes mesures.

2.2. Obtention des matrices à composites à base d'ELP M80.

2.2.1. Préparation des solutions.

L'ELP M80 alkylé a été préalablement dissous dans une solution de Sodium-Phosphate 10 mM à pH 6,5 (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) afin d'obtenir une solution d'ELPs à 20 % (m/v). Les peptides-SH, contenant une cystéine à leurs extrémités N- et C-terminale, ont été dissous dans un mélange 1:9 (v/v) d'éthanol et du même tampon sodium-phosphate jusqu'à l'obtention d'une concentration massique de 2,5 % (m/v).

2.2.2. Photo-réticulation des différentes matrices d'ELPs.

Le premier peptide de séquence CβA-**IKVAV**-GGG-*PVGLIG*-GGG-**YIGSR**-βAC est composé des deux séquences d'adhésion cellulaire IKVAV et YIGSR dérivées de la laminine, et de la séquence PVGLIG qui est un site de clivage des enzymes MMP2. Trois glycines ont été insérées de part et d'autre du site protéolytique pour permettre un meilleur accès aux protéases. Les groupes thiols des cystéines permettent la réticulation avec les alcènes présents dans l'ELP M80 chimiquement modifié.

Le deuxième peptide, SNA15 (Raj *et al*. 1992), a pour séquence CβA-**DDDEEKFLRRIGRFG**-βAC. C'est un peptide de nucléation du phosphate de calcium dérivé de la protéine salivaire stathérine (Bennick 1982).

Les deux peptides contenant les cystéines à leurs extrémités N et C-terminales ont été obtenus auprès de la société GenScript®.

Les matrices ont été produites sous irradiation UV par réaction thiol-ène avec un rapport équimolaire de thiol et d'alcène. Les concentrations des peptides-thiol et des ELP-alcène sont présentés dans le Tableau 1.

	2 % (m/v)	3 % (m/v)	4 % (m/v)
ELPM80	12,18	18,26	24,36
IKVAV/YIGSR	3,93	5,89	7,85
SNA15	3,90	5,84	7,79

Tableau 1 : Concentration en ELP et peptides en mg/ml utilisés pour former les matrices.

L'obtention du polypeptide modifié ELP M80-alcène, de masse moléculaire 33,7 kDa, a été décrite dans le chapitre précédent.

Les solutions contenant les mélanges d'ELPs et de peptides ont été préparées, pipetées dans des moules cylindriques en silicone de diamètres variables selon l'application, et congelées à -20 °C pendant 24 h. La réticulation chimique des matrices a été réalisée à l'aide du photoinitiateur Irgacure® 2959 (#410896, CAS Number : 106797-53-9, Sigma-Aldrich) (0,05 % m/v) sous exposition à la lumière UV (λ = 305 nm). Les matrices ont ensuite été hydratées pendant 24 h avant d'être lyophilisées (Figure 1). Différentes formulations de matrices ont été produites en faisant varier la concentration finale en ELPs et peptides, le temps de réticulation, et la concentration en HA.

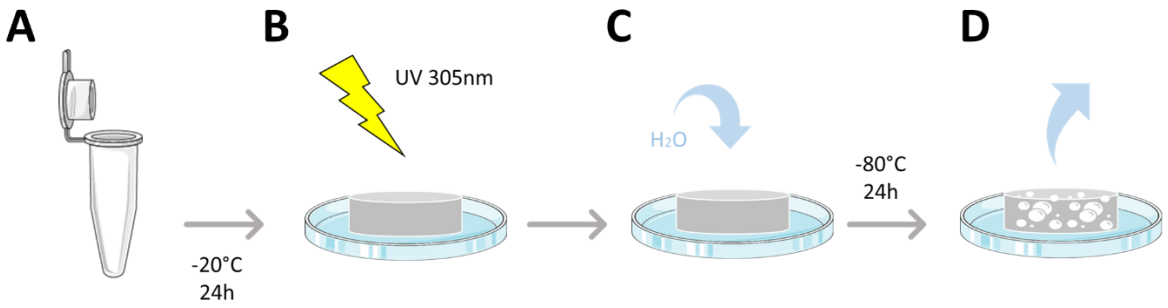


Figure 1 : Méthode de production des matrices à base d'ELPs.

(**A**) Tous les constituants sont préparés dans une même solution. (**B**) Ils sont ensuite déposés dans des moules et congelés à -20 °C pendant 24 h pour permettre la formation des cristaux d'eau, avant l'irradiation UV. La réticulation des thiols et alcènes se fait autour des cristaux d'eau. (**C**) Les matrices obtenues sont hydratées pendant 24 h puis congelées à -80 °C pour former d'autres cristaux d'eau. (**D**) Les matrices congelées sont lyophilisées, les cristaux d'eau se transforment en pores par sublimation.

2.3. Caractérisation des matrices composites d'ELPs.

2.3.1. Tests rhéologiques.

Tous les tests rhéologiques ont été réalisés avec des hydrogels hydratés et préalablement réticulés, sur un rhéomètre Kinexus pro + (Malvern Instruments®, Royaume-Uni). Les résultats ont été traités avec le logiciel rSpace®.

Tests de déformation : détermination du domaine linéaire de viscoélasticité.

La viscoélasticité linéaire caractérise le comportement élastique et dissipatif d'un matériau en petites déformations. Ici, une contrainte constante de fréquence 1 Hz à une température de 37°C a été appliquée, et la déformation au cours du temps a été mesurée.

Tests de balayage en fréquence et en température.

En rhéologie, un module est défini comme le rapport d'une contrainte par un déplacement (en Pa). Ce test nous permet de déterminer le module de stockage (G') et le module de perte (G''). G' correspond à l'énergie élastique emmagasinée pendant l'expérience, et G'' caractérise l'énergie dissipée sous forme de frottements visqueux.

Les balayages de fréquence ont été effectués avec une déformation constante (0,1 %) dans la plage de fréquence angulaire comprise entre 0,1 et 100 rad/s. Les mesures ont été faites à 20 °C (T<Tcp du d.ELP M80-alcène) et 37 °C (T>Tcp du d.ELP M80-alcène).

Pour les tests de balayage en température, elle a été augmentée de 1°C/min entre 10 et 50°C.

2.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB).

MEB couplé à la microanalyse à rayons X dispersive en énergie (EDX).

L'analyse par microscopie électronique à balayage a été réalisée afin de visualiser la microstructure de la matrice. Les échantillons ont été soumis à une métallisation avec des particules d'or et de palladium pendant 45 sec en utilisant le métaliseur Quorum®, puis ont été visualisés par MEB (HITACHI TM3030). Les matrices ont été observées à l'aide de détecteurs SEI et LEI fonctionnant à une tension d'accélération de 15 kV, avec une distance de travail d'environ 15 mm. Les grossissements ont varié entre 30 X, 100 X, 400X et 1000 X.

L'élément calcium a été identifié par EDX (FEI Quanta 250). Les matrices ont été évaluées à des grossissements multiples avec le MEB. Les pores ont été quantifiés à partir des images MEB en utilisant le logiciel ImageJ.

Cryo-Microscopie Electronique à Balayage.

Pour visualiser la microstructure de l'hydrogel et déterminer la taille des pores hydratés, une analyse par cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB) a été réalisée sur la plateforme Placamat (PLateforme Aquitaine de CAractérisation des MATériaux - Bordeaux, UMS CNRS 3626) avec le Dr Philippe Legros.

Les hydrogels ont été préalablement hydratés pendant 24 h dans de l'eau milliQ. Ils ont ensuite été montés sur un porte-échantillon, plongés dans de l'azote pâteux, puis transférés dans une préchambre de l'appareil Gatan Alto 2500 (Pleasanton, CA, USA) refroidie à -100 °C sous vide. Les échantillons ont ensuite été coupés avec un scalpel, et le contenu en eau a été sublimé à -40 °C pendant 5 min. Les échantillons ont ensuite été recouverts par une pulvérisation cathodique d'or-palladium pendant 120 sec, puis ils ont été transférés sur la platine cryogénique du microscope à une température d'environ -150 °C. La morphologie a été caractérisée par MEB (JEOL JSM- 6700F) en utilisant des détecteurs SEI et LEI fonctionnant à une tension d'accélération de 5 et 15 kV, avec une distance de travail d'environ 8 mm et des grossissements variant entre 100 x et 10 000 x. Des images d'au moins trois régions différentes de chaque hydrogel ont été enregistrées. Le logiciel ImageJ a été utilisé pour quantifier la taille des pores.

2.3.3. Interconnexion des pores.

Afin d'analyser l'interconnectivité des pores, les matrices ont été hydratées pendant une nuit dans du PBS 0,1 M, puis incubées pendant 10 min dans une solution contenant 1 µM de FITC-Dextrane 70 kDa (Sigma®). La diffusion de la fluorescence au cœur de la matrice a été évaluée avec un microscope confocal (Leica TCS SPE 5 Confocal Laser Scanning Microscope), en prenant des acquisitions totales de 500 µm en z, soit une acquisition tous les 5 µm. La microscopie confocale a été utilisée pour déterminer

l'interconnectivité des pores sur des matrices sans cellules. Une matrice de Pullulane / Dextrane (PuD) et une éponge de collagène ont été utilisées comme témoins positifs.

2.4. Test de viabilité cellulaire et de cytotoxicité.

La viabilité cellulaire dans les différentes matrices a été évaluée par le test Live/Dead® (Invitrogen #L3224). Ce test est basé sur une reconnaissance visuelle simple de la viabilité cellulaire : les cellules vivantes apparaissent en vert, alors que les cellules mortes apparaissent en rouge. Brièvement, le colorant non fluorescent acétoxyméthyl calcéine (AM) est transformé par l'activité estérase intracellulaire des cellules vivantes en calcéine fluorescente (verte). Pour les cellules mortes, l'homodimère-1 d'éthidium rouge fluorescent pénètre dans les cellules dont les membranes plasmiques ont été lysées, et va se lier à l'ADN double brin.

La solution de Live/Dead® a été préparée selon les recommandations du fabriquant. L'activation de la solution Live/Dead® a été réalisée à 37 °C pendant 15 min à l'abri de la lumière. Les matrices supplémentées en cellules ont été incubées avec la solution de Live/Dead® pendant 15 min à 37 °C. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide du microscope confocal (Leica TCS SPE 5 DMI 4000B).

2.5. Analyses statistiques.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad Prism 5.0 en utilisant les tests de Kruskal-Wallis ou d'ANOVA, suivis de post-tests de Dunett ou de Bonferroni, respectivement. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer deux groupes. Une valeur *p* inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

III. Formulation des hydrogels.

Pour économiser nos peptides bioactifs, des tests préliminaires d'optimisation ont été réalisés à l'aide d'un peptide de composition similaire. Ces essais nous ont permis de définir les concentrations en ELPs et peptides, les meilleurs rapports thiol/alcène ainsi que les temps optimaux d'irradiation sous UV pour catalyser la formation des liaisons covalentes.

La qualité des gels a été évaluée grâce à des analyses rhéologiques. De façon plus précise, pour obtenir une innervation efficace au sein d'un hydrogel, celui-ci doit avoir un module de conservation G' compris entre 1 kPa et 1,5 kPa (Koch *et al*. 2012). Un hydrogel possédant ces caractéristiques avait déjà été obtenu au laboratoire. Il était composé d'ELP M40-alcène à une concentration massique finale de 40,1 %, d'un peptide IKVAV à une concentration de 4,9 %, et de PEG-SH à 4 bras (20 kDa, JenKem® USA) à une concentration finale de 55,1 % (Dos Santos *et al*. 2019). L'un de nos objectifs était d'obtenir des hydrogels aux caractéristiques rhéologiques similaires mais dépourvus de PEG. En effet la présence de PEG peut empêcher une dégradation de l'hydrogel, et peut provoquer des réactions immunitaires (Branch *et al*. 2001).

3.1. Détermination des paramètres et formulation des hydrogels.

Le peptide GYSRI de séquence CβA-GYSRI-βAC est un peptide contrôle, ou « scramble », du peptide biologiquement actif YIGSR. Ce peptide a été utilisé pour les essais préliminaires. C'est un peptide linéaire, possédant à ses deux extrémités des cystéines fournissant les groupes thiols nécessaires à la photo-réticulation des hydrogels. Ces deux cystéines sont séparées du peptide GYSRI par des résidus alanine sous forme β. Cet acide aminé β-Ala est non naturel, et a ici un rôle d'espaceur. En effet, dans les expériences suivantes nous utiliserons des peptides biologiquement actifs, et la présence des acides aminés espaceurs entre les sites de couplage aux alcènes et la séquence peptidique permettra une meilleure interaction avec les cellules.

3.1.1. Choix du rapport molaire entre alcène et thiol.

3.1.1.1. Utilisation d'un Stratalinker à des fins de standardisation.

Dans le but de standardiser la méthode d'obtention des hydrogels, nous avons tout d'abord évalué l'utilisation d'un Stratalinker UV modèle 1800 de Stratagène®. Cet appareil a été développé pour fixer les molécules d'ADN ou d'ARN sur des membranes en nylon pour les analyses transcriptomiques de type « northern Blot » ou « Southern Blot ». L'avantage de cet outil est qu'il est possible de contrôler certains paramètres (temps d'exposition, énergie émise). L'idée était de déterminer les paramètres optimaux tels que l'énergie nécessaire à la réticulation complète de l'hydrogel. Cet appareil fonctionne

à une longueur d'onde de 254 nm, ce qui correspond au début du spectre d'absorption de l'Irgacure D2959 utilisé comme photo-amorceur de la réticulation des hydrogels (Figure 2).

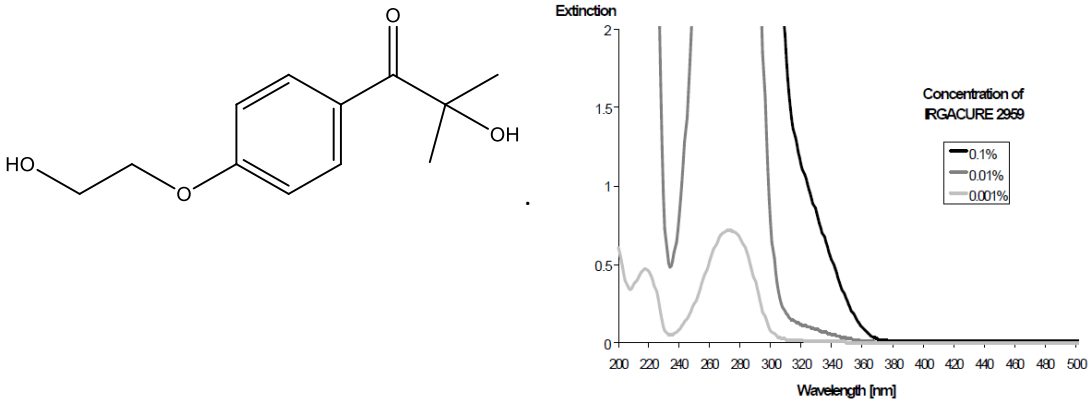


Figure 2 : Structure chimique et spectre d'absorption de l'Irgacure D-2959 (Ciba Specialty Chemicals Inc).

Des gels ont été obtenus avec l'ELP M80-alcène et le peptide GYSRI en utilisant un rapport molaire de X:Y et une concentration massique finale de 7,5 % (m/v), concentration identique à celle précédemment utilisée par Dos Santos et ses collaborateurs (Dos Santos *et al*. 2019).

3.1.1.2. Choix du rapport molaire entre alcène et thiol.

Différents rapports molaires (1:1, 1:3 et 2:1) entre les alcènes des ELPs et les thiols des peptides GYSRI ont été évalués.

Les différents constituants ont été mélangés puis déposés dans les puits d'une plaque de culture cellulaire. La plaque a ensuite été positionnée dans le stratalinker, et une énergie d'irradiation de 13,4 Joules a été appliquée. Le rapport équimolaire (1:1) entre les alcènes et les thiols a permis la formation d'un hydrogel. Le mélange contenant un excès d'alcène (1 alcène pour 3 thiols) ne s'est pas gélifié correctement, nous avons obtenu une solution visqueuse de couleur jaune. Cela pourrait être dû à la présence de tyrosines dans la séquence GYSRI qui, après oxydation, formeraient des liaisons dityrosine (Malencik *et al*. 1996). Le mélange contenant un excès de thiols (2 thiols pour 1 alcène) ne s'est pas gélifié de façon homogène, donnant des morceaux de gels dispersés dans une phase liquide.

Compte-tenu de ces résultats, le nombre de fonctions alcènes disponibles pour la réticulation semble être un critère plus important que le nombre de thiols. Le rapport équimolaire semblait le plus à même de donner une structure capable de former des hydrogels homogènes**.**

Tous les hydrogels présentés dans la suite du document ont donc été produits avec un rapport équimolaire entre les groupements thiols des peptides et les alcènes de l'ELP.

Au cours de cette étape d'optimisation, nous avons été confrontés à un problème d'utilisation du Stratalinker : en raison d'une puissance trop faible (3000 µwatts/cm^2) plusieurs heures d'irradiation

étaient nécessaires pour former les hydrogels. Pour la suite des expériences, nous avons donc décidé de revenir à un système d'irradiation plus complexe à normaliser, mais qui avait déjà fait ses preuves (Dos Santos *et al*. 2019). Le transilluminateur est un appareil normalement utilisé pour visualiser les molécules d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose. L'appareil émet à une longueur d'onde de 305 nm, ce qui correspond à la fin du spectre d'excitation de l'Irgacure D2959 (voir Figure 2). L'avantage de ce système est que la puissance d'irradiation (10000 µW/cm²) est très largement supérieure à celle développée par le stratalinker. Le transilluminateur présente en revanche deux inconvénients. Le premier est qu'il n'y a aucun moyen de contrôler la quantité d'énergie reçue par l'échantillon. Or, il est connu que les tubes UV perdent de leur efficacité au cours du temps, et il est donc probable que l'énergie reçue par l'échantillon puisse varier entre plusieurs expériences, et que cette énergie varie d'un transilluminateur à l'autre. Le second inconvénient est que le montage reste peu standardisé, la distance entre l'échantillon à irradier et la source des UVs pouvant légèrement varier d'une expérience à l'autre.

3.1.2. Choix du polymère constitutif des hydrogels : ELP M80-alcène ou d.ELP M80-alcène.

3.1.2.1. Choix du polymère entre l'ELP M80-alcène et le d.ELP M80-alcène.

Deux types de gels ont été produits dans les mêmes conditions, les premiers sont composés de l'ELP M80-alcène, et les seconds des d.ELP M80-alcène (voir Chapitre 1). Notre objectif était de savoir si les gels obtenus dans ce dernier cas étaient thermosensibles, ce qui ne pouvait pas être le cas des gels obtenus avec l'ELP M80-alcène puisque ce dernier n'avait pas de Tcp (voir Chapitre 1).

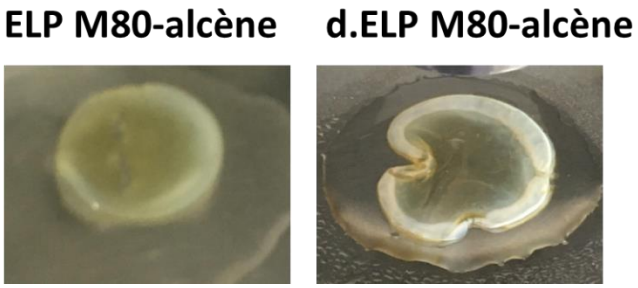


Figure 3 : Photo représentant les gels d'ELP M80-alcène et de d.ELP M80-alcène chauffés à 50°C.

Les gels ont été obtenus en rapport équimolaire avec le peptide GYSRI, après 8 minutes d'exposition aux UV. Ces gels étaient tous à une concentration massique finale de 7,5 % (m/v). Les gels ont été réalisés dans des moules spéciaux correspondant au diamètre du rhéomètre. Après immersion dans une solution de PBS, ils ont été chauffés à 50 °C.

Les gels obtenus avec les ELP M80-alcène et d.ELP M80-alcène ont été analysés par des tests rhéologiques, le but principal étant d'obtenir la relation entre la contrainte appliquée au matériau et la déformation résultante afin de choisir l'hydrogel présentant les meilleures propriétés. Ces gels avaient une forme cylindrique, une épaisseur de 1 mm et un diamètre d'environ 2 cm.

3.1.2.2. Analyses rhéologiques.

3.1.2.2.1. Tests de déformation.

Pour ce premier test, une fréquence constante de 1 Hz (6,283 rad/s) a été appliquée à une température de 37 °C. Ce test permet de déterminer la limite d'élasticité des gels, celle-ci étant déterminée par la rupture de la linéarité des fonctions G' (ou G'') = f(% déformations). Les modules G dépendent essentiellement des mouvements des segments des chaînes polymériques et de la densité des zones de jonction. On observe sur la Figure 4 l'évolution des modules G' et G'' en fonction du pourcentage de déformation pour les deux types de gel étudiés.

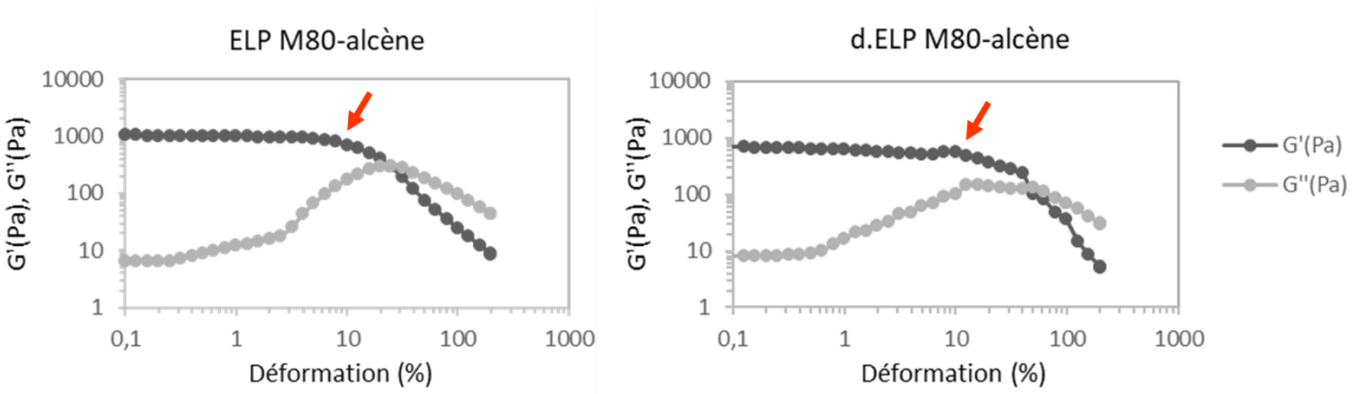


Figure 4 : Analyse rhéologique des hydrogels composés d'ELP M80-alcène et de d.ELP M80-alcène.

Les hydrogels ont été produits dans un moule cylindrique avec un diamètre de 2 mm et une épaisseur de 1 mm, à une concentration finale de 7,5 % (m/v). Une contrainte constante a été appliquée (fréquence = 1 Hz) à une température de 37 °C. Le pourcentage de déformation varie de 0,01 % à 200 %. Les flèches rouges indiquent le point de rupture.

Nous observons que jusqu'à environ 10 % de déformation le module G' des deux types d'hydrogels est indépendant de l'amplitude appliquée. Cela correspond au domaine linéaire de viscoélasticité. Nous observons ensuite l'apparition d'une rupture, avec un point de déformation critique à 10 % pour le gel à base d'ELP M80-alcène et à 12 % pour le gel composé de d.ELP M80-alcène. Ces résultats suggèrent que les gels à base d'ELP M80-alcène pourraient être un peu moins résistants que ceux à base de d.ELP M80-alcène, mais la différence ne semble pas significative.

On note que les points auxquels se croisent le module de conservation G' et le module de perte G'' sont différents pour les deux types de gels. Ils se trouvent respectivement à 20 % et 40 % de déformation, suggérant une plus grande résistance à la déformation des gels constitués des ELP-alcènes déméthylés.

3.1.2.2.2. Test de balayage en fréquence.

Le test de balayage en fréquence d'oscillation est un test où l'échantillon est soumis à différentes fréquences d'oscillations, variant ici de 0,1 à 100 rad/s, pour mesurer les changements du module G' élastique (ou de stockage). Dans notre cas, nous avons aussi voulu obtenir des informations quant à

l'influence de la température sur les caractéristiques mécaniques des gels. Pour cela, les mesures ont été effectuées à 20 °C et 37 °C, soit au-dessous et au-dessus de la Tcp des d.ELP M80-alcène (Tcp = 26,1 °C, *cf.* Chapitre 1). Les résultats sont montrés dans la Figure 5.

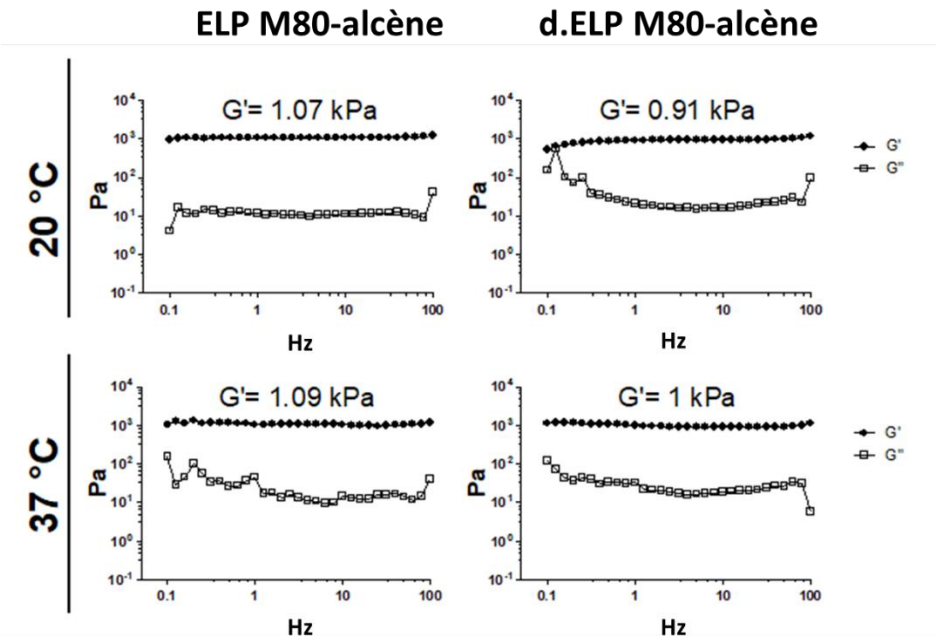


Figure 5 : Test de balayage en fréquence des hydrogels à base d'ELP M80-alcène ou de d.ELP M80-alcène.

La concentration des hydrogels était de 7,5 % (m/v). Le module de stockage (G') est indiqué. Les mesures ont été réalisées à 20 °C et 37 °C.

Pour chaque échantillon et température, nous observons que la valeur de G' reste relativement constante à toutes les fréquences étudiées, ce qui confirme que nous avons bien obtenu des gels.

Les modules G' des gels à base d'ELP M80-alcène sont respectivement de 1,07 et 1,09 kPa à 20 °C et 37 °C, indiquant l'absence de thermosensibilité. Ces résultats sont concordants avec ceux préalablement obtenus dans le Chapitre 1 montrant la perte de Tcp de l'ELP M80 après alkylation. De façon plus surprenante, les valeurs du module G' des gels composés de d.ELP M80-alcène, sont similaires à 20 °C (0,91 kPa) et 37 °C (1 kPa). Or, on pouvait s'attendre à des valeurs plus élevées à 37 °C en raison de la coacervation des polymères de d.ELP M80-alcène (Tcp d'environ 26,1 °C). Il apparaît donc que ce phénomène de coacervation pourrait disparaitre quand les chaînes de polymères sont réticulées, la présence de liaisons covalentes inter-chaînes ne permettant pas les changements de conformation nécessaires au processus de coacervation.

Pour conclure, les propriétés rhéologiques des hydrogels sont globalement similaires, que les ELPs possèdent une Tcp (d.ELP M80-alcène) ou pas (ELP M80-alcène).

3.1.2.2.3. Tests de balayage en température.

Un gel est formé de deux milieux dispersés l'un dans l'autre. Le premier milieu est dit « solide », et est constitué de longues molécules connectées entre elles par des points de réticulation pour former le réseau tridimensionnel (3D), et le second est un milieu liquide, appelé « solvant ». Dans les gels chimiques, les monomères sont associés entre eux par des points de réticulation de forte énergie, les liaisons covalentes. Le réseau alors formé possède une très grande stabilité et ne peut être dissous que par réversion des liaisons covalentes et/ou dégradation des polymères. Dans notre cas, les liaisons thiol-ène sont irréversibles.

Les expériences précédentes avaient été effectuées à deux température (20 et 37 °C). Pour avoir une vision plus fine de l'effet de la température, nous avons mesuré le module G' en faisant varier la température de 10 à 50 °C (Figure 6).

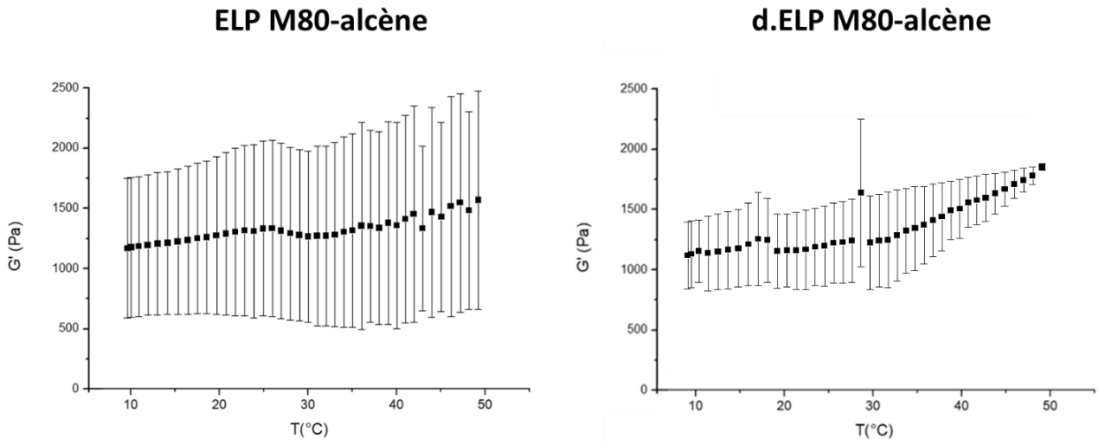


Figure 6 : Test de balayage en température des hydrogels à base d'ELP M80-alcène et de d.ELP M80-alcène.

Les hydrogels étaient à une concentration de 7,5 % (m/v). Le module de stockage (G') est indiqué. Les mesures ont été réalisées sur 4 hydrogels ELP M80-alcène et 3 hydrogels d.ELP M80-alcène, en faisant varier la température de 10 à 50 °C.

Pour les gels d'ELP M80-alcène, le module G' a varié de 1126 +/-558 Pa à 10 °C jusqu'à 1513 +/- 875 Pa à 50 °C. Pour les gels d.ELP M80-alcène, le module G' a varié entre 1234 +/- 413 Pa à 20 °C et 1712 +/- 78 Pa à 50 °C. Ces résultats confirment qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux hydrogels à des températures physiologiques. La légère augmentation de la valeur G' observée pour les deux gels au-dessus de 40 °C ne peut pas être attribuée à un phénomène de coacervation puisque les ELP M80-alcènes ont perdu cette propriété. Nous pensons plutôt que cela traduit une légère déshydratation des hydrogels, qui entraîne une compacité plus importante.

Nous pouvons également noter une grande variabilité des résultats obtenus pour un même type de gel. Cela pourrait s'expliquer par la variation du nombre de liaisons covalentes créés par la réaction thiol-ène dans les gels d'une même composition. Pour confirmer cette hypothèse, nous aurions pu

doser les cystéines libres qui n'ont pas réagi lors de la formation du gel. L'inconvénient de ce type de dosage est toutefois que l'hydrogel doit être préalablement dissous, ce qui nécessite la rupture des liaisons covalentes. Il n'est donc pas possible de distinguer les thiols libres de ceux qui étaient auparavant engagés dans les liaisons thiol-ène. Toutefois, nous remarquons pour les gels d.ELP M80-alcène une diminution de l'écart-type entre 40 et 50 °C : cela pourrait s'expliquer par la présence d'ELPs non réticulés dans le gel, et ces ELPs thermosensibles pourraient s'agréger et modifier la valeur de G'. Toutefois, il est vraisemblable que ces d.ELPs M80-alcène libres soient présents en trop faible concentration pour avoir un effet plus marqué sur la rigidité du gel.

3.1.2.2.4. Analyse de la cytotoxicité des hydrogels.

La cytocompatibilité de nos hydrogels à base d'ELP M80-alcène et de d.ELP M80-alcène a été évaluée par un test de viabilité cellulaire. Nous avons utilisé des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse de rat (*rMSCs*) et un test Live/Dead qui permet le marquage fluorescent des cellules vivantes et mortes. Les cellules vivantes émettent une fluorescence verte tandis que les cellules mortes fluorescent dans le rouge.

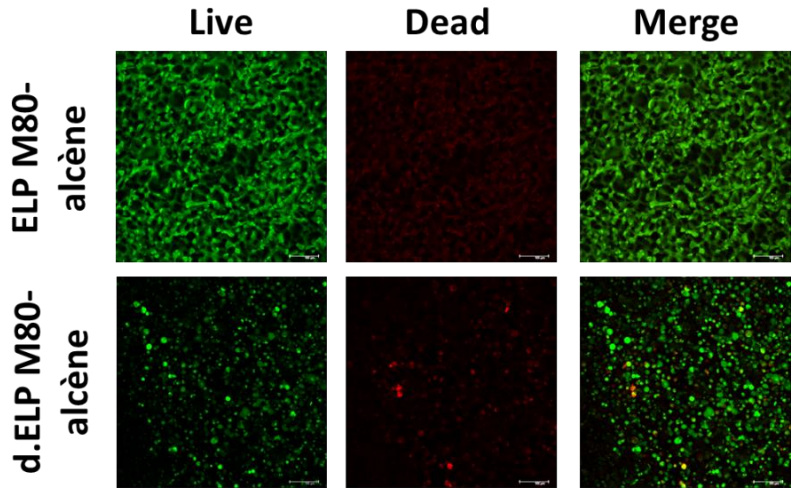


Figure 7 : Cytotoxicité des hydrogels d'ELP M80-alcène et de d.ELP M80-alcène.

Images au microscope à fluorescence des rMSCs après 4 jours de culture dans les deux types d'hydrogels, colorées avec le test Live/Dead. Les cellules viables sont marquées à la calcéine (vert) et les cellules non viables sont marquées à l'éthidium (rouge). Barre d'échelle = 100µm.

Les deux hydrogels ont été ensemencés avec le même nombre de cellules issues d'une même culture. La culture des rMSCs sur les hydrogels a été maintenue pendant 4 jours, puis un test de viabilité cellulaire a été réalisé (Figure 7). Nous observons l'absence de cellules mortes avec les hydrogels d'ELP M80-alcène, alors que nous en détectons après culture sur les hydrogels constitués de d.ELP M80-alcène. Par ailleurs, dans les gels d'ELP M80-alcène nous observons un grand nombre de cellules, et celles-ci ont une morphologie allongée propre aux MSCs. Une quantité moindre de cellules a été visualisée sur les hydrogels constitués de d.ELP M80-alcène, et celles-ci sont de forme arrondie. Cette mortalité cellulaire observée en présence des hydrogels de d.ELP M80-alcène est peut-être due à la

présence de traces de méthanol qui a été utilisé lors des dialyses du polymère. Bien que n'ayant détecté en RMN du proton aucun pic correspondant au méthanol, nous ne pouvons pas exclure la présence de traces de cet alcool toxique pour les cellules (Lawrence & Haggerty 1971).

Pour conclure ce paragraphe 3.1.2, contrairement à nos attentes, les analyses rhéologiques des hydrogels n'ont pas montré d'avantages à utiliser le d.ELP M80-alcène plutôt que l'ELP M80-alcène, bien que le premier soit thermosensible à l'état de monomère. Le fait que ce polymère soit utilisé dans un hydrogel réticulé par liaison chimique empêche le repliement total du polymère pour sa coacervation *a contrario* des gels physiques dans lesquels les ELP ont la capacité de changer de conformation (Betre *et al*. 2002; Martín *et al*. 2009; Trabbic-Carlson *et al*. 2003). D'autre part, les étapes successives de modifications chimiques de thioalkylation (rendement de 87,0 %) et de déméthylation (rendement de 68,3 %) sont laborieuses et entraînent une perte de polymère. Enfin, les tests de cytotoxicité cellulaire montrant une mortalité des rMSCs avec les hydrogels constitués de d.ELP M80-alcène, **nous avons choisi d'abandonner l'utilisation de ce polymère pour nous consacrer à l'utilisation d'hydrogels à base d'ELP M80-alcène non déméthylés.**

3.2. Synthèse des particules d'hydroxyapatite (HA) pour la formation des matrices composites.

L'objectif de cette thèse est de développer des matrices composites composées d'une phase organique fonctionnalisable (ELPs, peptides biomimétiques, peptide SNA15) et d'une phase inorganique composée d'HA pour mimer au mieux la structure osseuse.

3.2.1. Synthèse de particules d'HA.

Il existe différentes techniques de synthèse de particules d'HA, parmi lesquelles on peut dénombrer la co-précipitation (Krylova *et al*. 2002; Ma *et al*. 2003; McLeod *et al*. 2006), la voie hydrothermale (Ripamonti *et al*. 1993; Roy & Linnehan 1974), l'irradiation micro-ondes (Kundu *et al*. 1998; Ma *et al*. 2006; Manjubala *et al*. 2002), la voie sol-gel, et la voie solide. Nous avons choisi la technique de co-précipitation chimique humide pour la synthèse d'HA, telle que précédemment réalisée par Fricain et collaborateurs (Fricain *et al*. 2013). Elle présente l'avantage de ne pas ajouter de contre-ions résiduels et permet de conserver la bioactivité de l'HA. Brièvement, la réaction de synthèse de l'HA est présentée Figure 8.

$$10\ Ca(OH)_2 + 6\ H_3PO_4 \rightleftharpoons Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18\ H_2O$$

Figure 8 : Réaction chimique de synthèse de l'hydroxyapatite à partir de calcium hydroxyde et d'acide phosphorique, selon (Fricain *et al*. 2013).

La formation d'HA va produire 18 molécules d'eau qui seront ensuite éliminées par lyophilisation pour ne garder que la partie minérale.

3.2.2. Caractérisation physicochimique des particules d'HA.

Quatre lots d'hydroxyapatite ont été synthétisés, tamisés et lyophilisés sous forme de poudre pour conservation. La pureté des poudres d'HA a été analysée par spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (FTIR) (Figure 9).

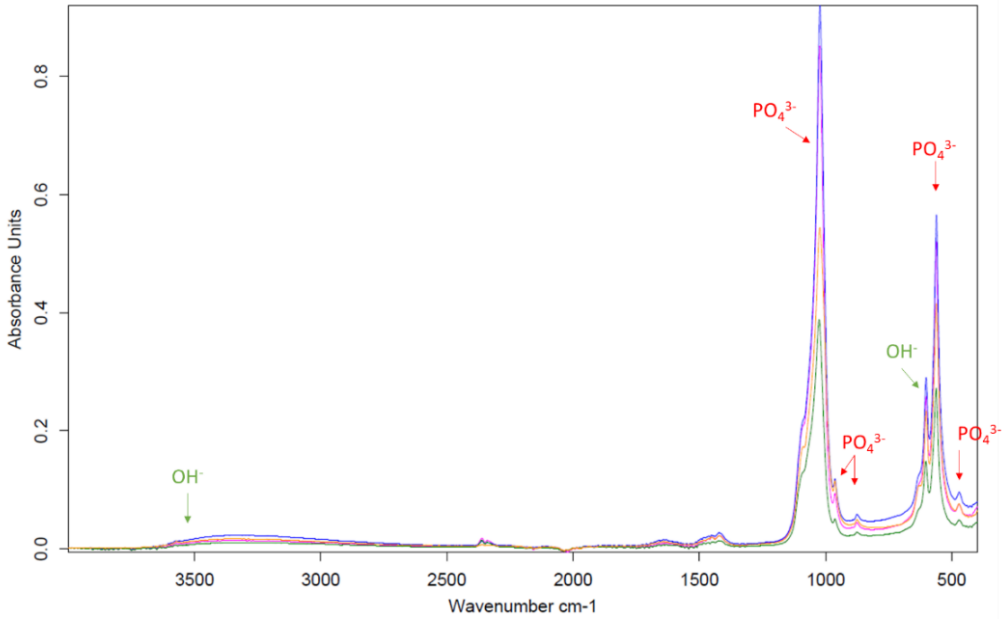
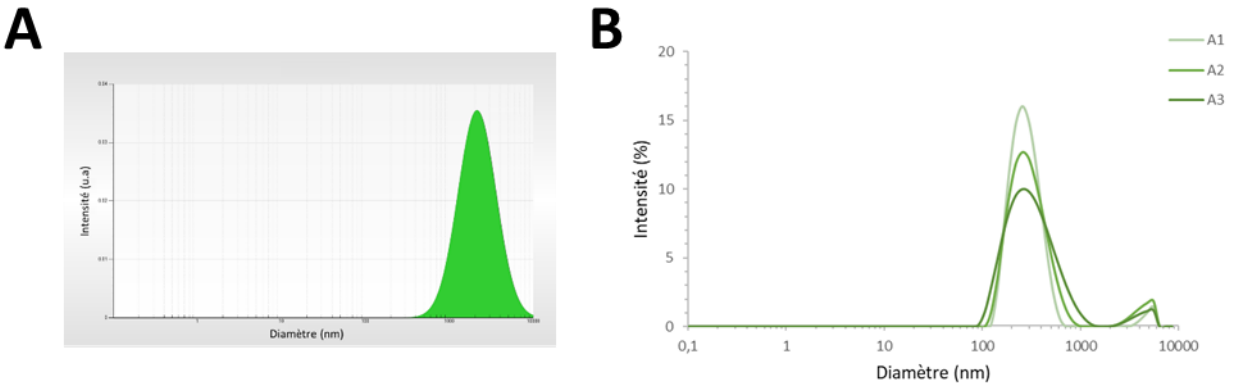


Figure 9 : Analyse de l'hydroxyapatite par spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (FTIR).

Les spectres FTIR des quatre échantillons montrent des bandes caractéristiques des particules d'hydroxyapatites. Les bandes correspondant aux ions PO_4^{3-} sont présentes à 470, 560, 875, 962 et à 1022 cm^{-1}. Les bandes correspondantes aux groupes OH^- ont des vibrations à 630 cm^{-1} et à 3570 cm^{-1}. La présence des carbonates est visible à 1415 cm^{-1}. L'attribution des bandes étant conforme aux données de la littérature (Merry *et al*. 1998; Ślósarczyk *et al*. 1997), nous pouvons conclure que nous avons bien synthétisé des particules d'HA, et que le produit est pur.

Pour déterminer quelle était la taille des particules d'HA, leur diamètre hydrodynamique a été mesuré par DLS (*Dynamic Light Scattering*) à 25°C (Figure 10).

La population d'hydroxyapatite a un diamètre hydrodynamique moyen de 1420 nm après 31 s de mesure, puis le diamètre mesuré augmente jusqu'à 2114 nm après 106 s. Parallèlement, on observe une légère augmentation de la polydispersité de 0,310 à 0,378. Ces résultats indiquent que les particules d'HA se sont agrégées entre les deux temps d'acquisition. Afin de déterminer la taille des plus petites particules obtenues, nous avons filtré l'échantillon (0,8 µm) pour éliminer les agrégats avant de refaire une mesure.



	Acquisition	Temps (s)	Diamètre (nm)	PDI
Avant filtration	1	31,03	1420,5	0,31
	2	73,16	1774,6	0,313
	3	106	2114,9	0,378
Après Filtration (0,8 µm)	1	20	269,5	0,215
	2	40	293,3	0,255
	3	60	286,6	0,259

Figure 10 : Diamètre hydrodynamique des particules d'HA.

La poudre d'HA a été préparée à 20 mg/mL dans un tampon PBS 10 mM pH 6,5. Les mesures du diamètre thermodynamique ont été réalisées à l'aide d'une DLS Cordouan® pour les échantillons non filtrés, ou d'une DLS Malvern® pour les échantillons préalablement filtrés. Le tableau indique les valeurs obtenues. A1 = acquisition 1, A2 = acquisition 2, A3 = acquisition 3.

La moyenne des valeurs mesurées pour le diamètre hydrodynamique des particules était de 283 nm après filtration (Figure 10B). Là encore, nous avons pu observer l'agrégation des particules en fonction du temps (augmentation du pic autour de 5 µm). Ainsi, les particules d'HA se réorganisent après filtration pour former de plus grosses particules. Ces particules supérieures à 5 µm n'ayant pas pu passer à travers le filtre, elles se sont forcément auto-assemblées après l'étape de filtration.

Ces résultats indiquent que les particules d'HA synthétisées s'assemblent sous forme micrométrique, et non sous forme nanométrique comme précédemment indiqué (Fricain *et al*. 2013). Etant donné que l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) ainsi que les instances

européennes peinent à légiférer sur les produits nanoparticulaires, ces données viennent nous conforter dans le choix de l'HA comme composant inorganique de notre matériel.

3.3. Temps d'exposition sous UV et réticulation.

En tenant compte de l'importance de la porosité pour notre hydrogel, l'étape suivante de notre processus de caractérisation a consisté à optimiser les matrices en fonction de plusieurs facteurs : le temps de réticulation, la concentration massique finale en ELPs et peptides, et la concentration en HA.

Tout d'abord, nous avons testé le temps de réticulation. Nous avons produit des matrices à 4 % (m/v) composées d'ELP M80-alcène, de peptide biomimétique contenant les séquences IKVAV, PVGLIG et YIGSR, du peptide SNA15, et contenant ou non de l'HA. L'irradiation UV a été effectuée pendant 5 min, 8 min ou 15 min.

Les matrices déshydratées ont été ensuite observées en microscopie électronique à balayage (MEB). Les images ont été utilisées afin de quantifier la taille des pores (Figure 11).

Pour les gels dépourvus d'HA, le diamètre des pores moyen est de 226 +/- 119 µm après 5 min de réticulation, de 103 +/- 61 µm après 8 min de réticulation et de 39 +/- 14 µm après 15 min de réticulation. Ces résultats suggèrent que plus le temps de réticulation est court (5 min), plus les pores sont grands. En effet, très peu de pores ont été observés dans les hydrogels après 15 minutes de réticulation. Nous avons émis l'hypothèse que plus le temps de réticulation est long, plus les matrices congelées sont susceptibles de dégeler. Il en résulte des matrices plus rigides, en raison d'un taux de réticulation plus élevé, et des pores plus petits en raison de la décongélation qui diminue la taille des cristaux de glace.

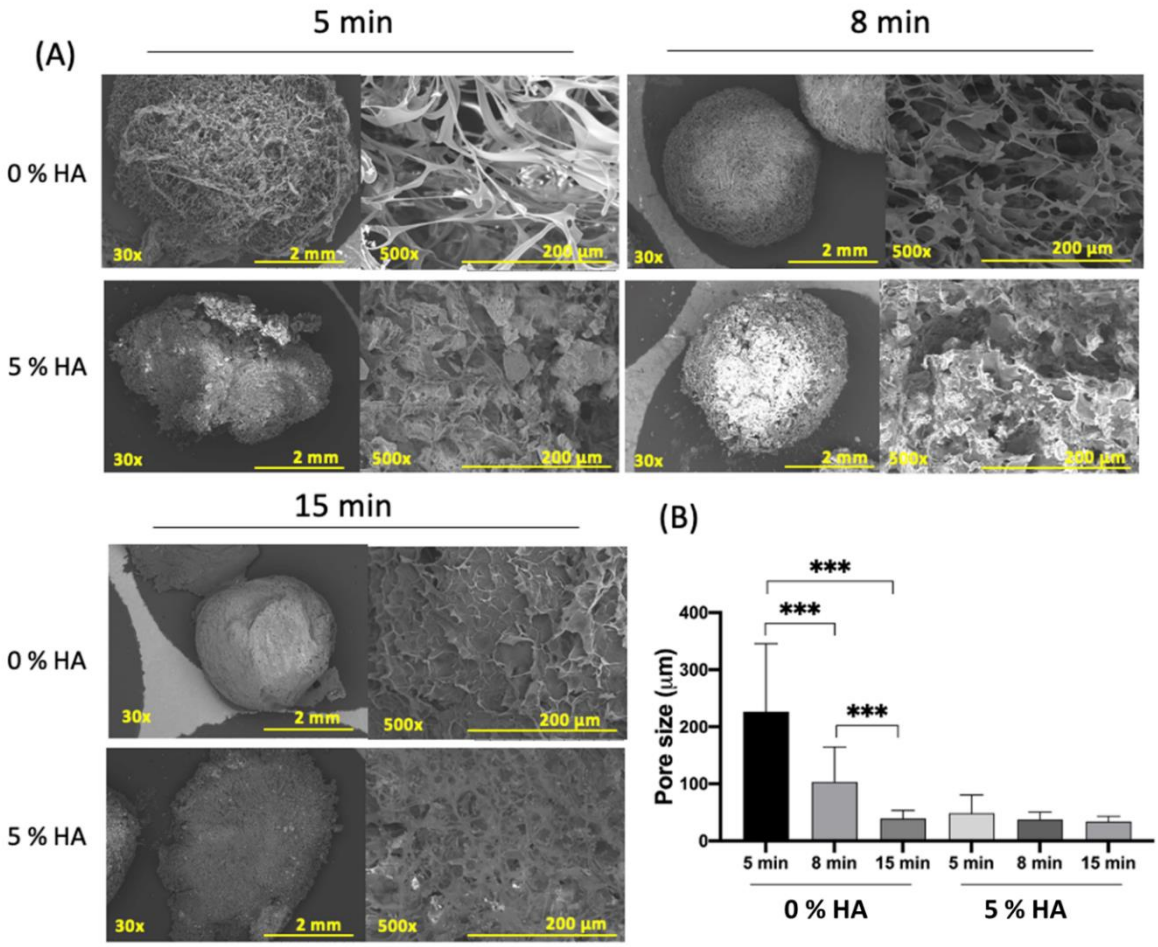


Figure 11 : Structure et quantification de la taille des pores des matrices de 4 % (m/v) déshydratées avec 0 % ou 5 % (m/v) d'HA.

(**A**) Analyse par MEB des matrices produites avec différents temps de réticulation (5, 8 et 15 min). Grossissement 30 x et 500 x, les barres sont indiquées sur les Figures (2 mm et 200 µm, respectivement). (**B**) La taille des pores a été quantifiée avec le logiciel ImageJ. Les données sont représentées comme une moyenne ± écart type. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Bonferroni comme post-hoc) (*** p <0,001).

Concernant les matrices contenant les particules d'HA, le diamètre moyen des pores est de 49 +/- 32 µm, 37 +/- 13 µm et 34 +/- 9 µm aux temps de réticulation de 5, 8 et 15 min. Le temps de réticulation a donc une influence sur la taille des pores des matrices sans HA, mais peu pour les matrices contenant 5 % (m/v) d'HA. Ceci suggère que l'hydroxyapatite interfère dans le processus de formation des pores, indépendamment du temps de réticulation, en limitant l'espace disponible pour la formation des cristaux de glace.

Pour la suite du développement de l'hydrogel composite, nous avons donc choisi un temps de réticulation de 8 min afin d'avoir une taille de pores et une réticulation suffisante.

3.4. Choix de la concentration en ELP M80-alcène et en particules d'HA.

L'effet de la concentration finale de la matrice sur la taille des pores a ensuite été évalué. Des matrices à 2 % (m/v), 3 % (m/v) et 4 % (m/v) d'ELP et peptides ont été produites en faisant varier la

concentration en HA. Leur microstructure a ensuite été analysée par MEB (Figure 12). Nous avons émis l'hypothèse qu'en diminuant la concentration des protéines et peptides, une plus grande quantité d'eau pourrait être contenue dans la matrice, ce qui augmenterait le nombre et la taille des pores. Par ailleurs, la diminution des réactifs nécessaires à la formation des matrices peut présenter un intérêt économique par rapport au coût du produit final.

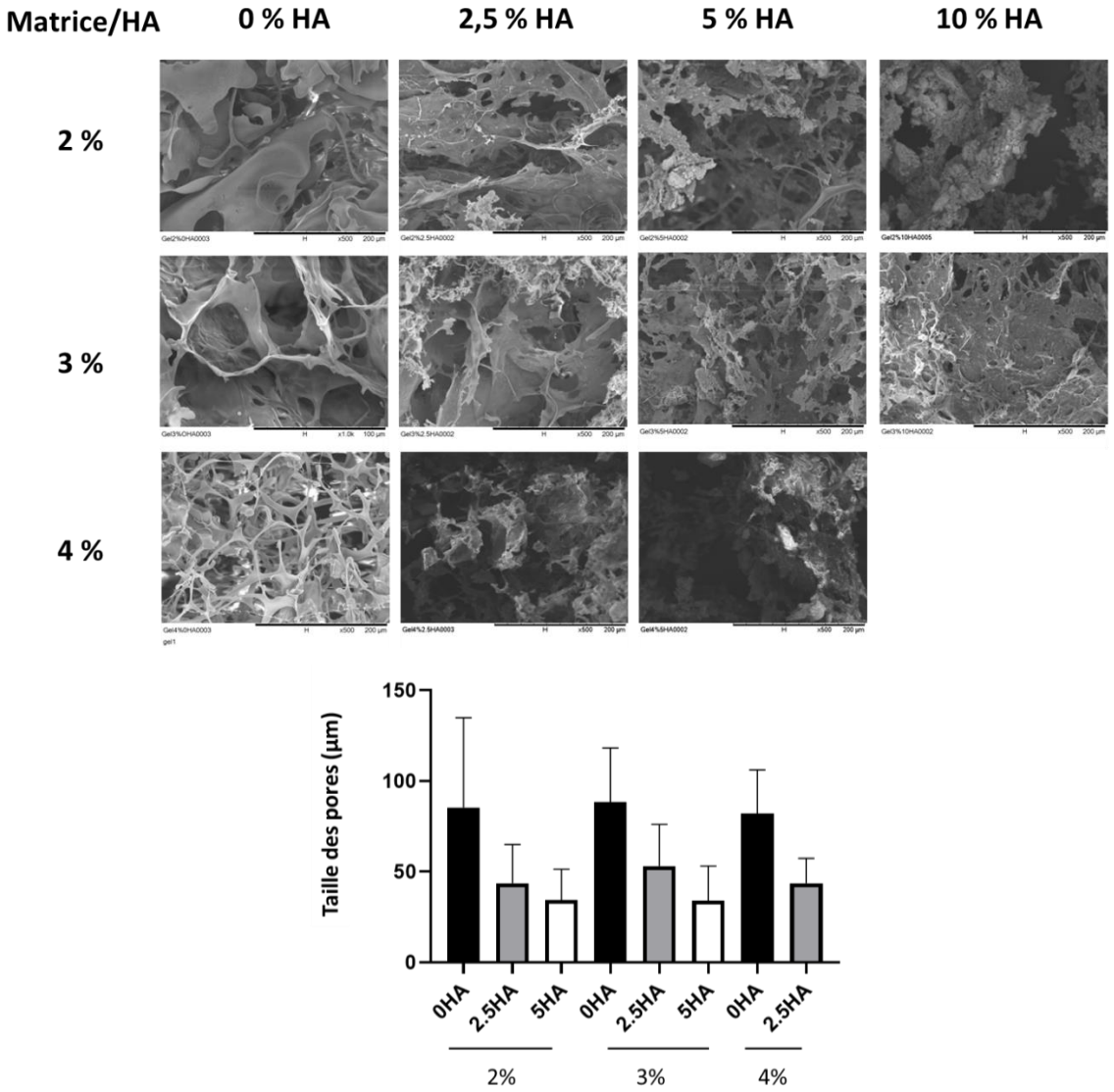


Figure 12 : Structure et taille des pores des matrices en fonction des concentrations en ELPs, peptides, et en particules d'HA

(**A**) Aspect des matrices lyophilisées en MEB contenant 2 %, 3 % et 4 % (m/v) d'ELPs et de peptides, les barres d'échelles sont indiquées (100 µm ou 200 µm). (**B**) Quantification de la taille des pores. Les données sont représentées comme une moyenne ± écart type (7 <n <26). Aucune différence statistique n'a été observée (ANOVA avec test de Bonferroni comme test post-hoc ou Mann-Whitney).

La Figure 13 montre l'aspect des matrices après lyophilisation. Les matrices à 3 % d'ELPs et peptides (m/v) semblent conserver leur structure quelles que soient les concentrations en HA, tandis que les

matrices à 2 % (m/v) et 4 % (m/v) en polymères ont des structures poudreuses (non entièrement réticulées) en présence d'HA.

Les images obtenues en MEB sont présentées dans la Figure 12.

- Pour les matrices à 2 % d'ELP et peptides, le diamètre moyen des pores est de : 85 +/- 49 µm sans HA ; 43 +/- 21 µm avec 2,5 % d'HA ; et 34 +/- 17 µm avec 5 % d'HA.
- Pour les matrices à 3 %, le diamètre moyen des pores est de : 78 +/- 43 µm sans HA ; 53 +/- 23 µm avec 2,5 % d'HA ; et 34 +/- 19 µm avec 5 % d'HA.
- Pour les matrices 4 % le diamètre moyen des pores quantifié est de 82 +/- 23 µm sans HA ; et 43 +/- 13 µm avec 2,5 % d'HA.
- En ce qui concerne le gel contenant 5 % d'HA, le diamètre moyen n'a pas pu être quantifié du fait d'une structure poudreuse non entièrement réticulée.

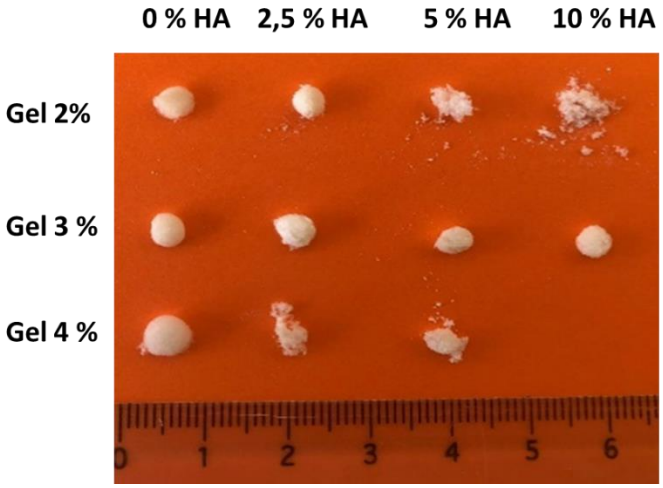


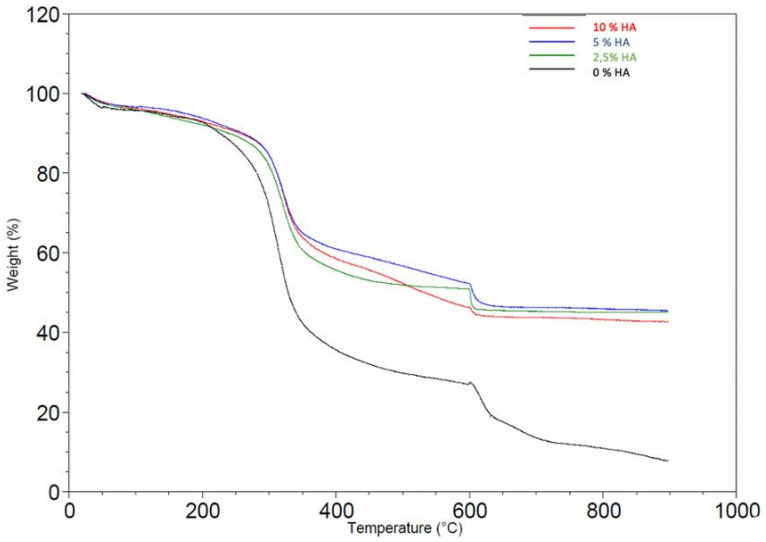
Figure 13 : Images des matrices à 2, 3 et 4 % (m/v) en ELPs et peptides obtenues en présence de différentes concentrations en HA après un temps d'irradiation de 8 min.

En absence d'HA, on observe une densité apparente du maillage qui augmente proportionnellement à la concentration en polypeptide et peptides. Le nombre de pores augmente mais leur taille diminue. En présence d'HA, la taille des pores ne dépend donc pas de la concentration en matrice mais de la concentration en HA (Figure 12).

Suite à l'obtention de ces résultats, les matrices produites seront de concentration massique 3 % (m/v) en ELP et peptides.

L'obtention de structures non entièrement réticulées nous a amené à étudier la capacité de la matrice à base d'ELP à retenir les particules d'HA à des concentrations supérieures à sa propre concentration massique. La capacité de rétention de l'HA dans la matrice a alors été analysée par thermogravimétrie

(TGA, Figure 14). Cette analyse permet la mesure de la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température. Cette technique permet d'avoir accès à la quantité de composés inorganiques présents dans la matrice, la quantité d'HA dans notre cas.



	0 % HA	2,5 % HA	5 % HA	10 % HA
% Théorique	0	45,5	62,5	76,9
% Réel	7,7	45,2	45,5	42,7

Figure 14 : Analyse thermogravimétrique (TGA) des matrices contenant 0 %, 2,5 %, 5 % et 10 % HA.

Le graphique montre la perte de masse (en %) des matrices ELP dépourvues d'HA (**noir**), contenant 2,5 % HA (**vert**), 5 % HA (**bleu**) et 10 % HA (**rouge**) selon la température (0 ° C- 1000 ° C). Le tableau met en évidence le pourcentage (m/v) réellement mesuré d'HA dans la matrice comparativement aux résultats théoriques. Les résultats théoriques ont été obtenus en considérant la concentration massique de la partie HA rapporté à 100 %, par exemple pour un gel 3 % (ELP + peptide) et 2,5 % de HA, la masse totale correspond à 5,5 %, si on la reporte à 100 % alors la masse d'HA correspond à 45,5 % et celle de la partie organique à 54,5 %.

Des matrices à 3 % d'ELPs et peptides produites avec 0 %, 2,5 %, 5 % et 10 % (m/v) d'HA ont été analysées par TGA.

- Pour les gels sans HA, le pourcentage de résidus inorganiques était de 7,7 %.
- Pour les gels à 3 % contenant 2,5 % d'HA, nous avons mesuré un taux de composés inorganiques de 45,2 % ce qui est proche du résultat théorique attendu de 45,4 %.
- Pour les gels avec 5 % d'HA, le pourcentage de composés inorganiques théorique était de 62.5 %, mais nous avons mesuré un taux de seulement 45,5 %.
- Pour les matrices constituées en présence de 10 % d'HA, on retrouve une valeur similaire de composés inorganiques (42,7 %) alors que nous attendions 76,9 % si toutes les particules d'HA

avaient été incorporées dans le gel. Il y a donc un phénomène de saturation, la matrice ne permettant pas d'absorber une concentration d'HA supérieure à 2,5 %.

Nous avons décidé d'utiliser une concentration finale maximale de HA de 2,5 % (m/v) pour la production des matrices.

Pour la suite des expérimentations nous avons choisi les paramètres suivants : un temps de réticulation de 8 min, un rapport équimolaire entre les thiols et les alcènes, et une concentration massique finale en ELP et peptides de 3 % (m/v). Nous savons qu'une telle matrice ne peut retenir en son sein qu'une concentration maximale de 2,5 % (m/v) d'HA, nous allons donc pour la prochaine partie nous concentrer sur la caractérisation de la matrice à 3 % d'ELP et peptides contenant 0 % (contrôle), 1 %, 2 % et 2,5 % (m/v) d'HA.

IV. Caractérisation des matrices de formulation finale.

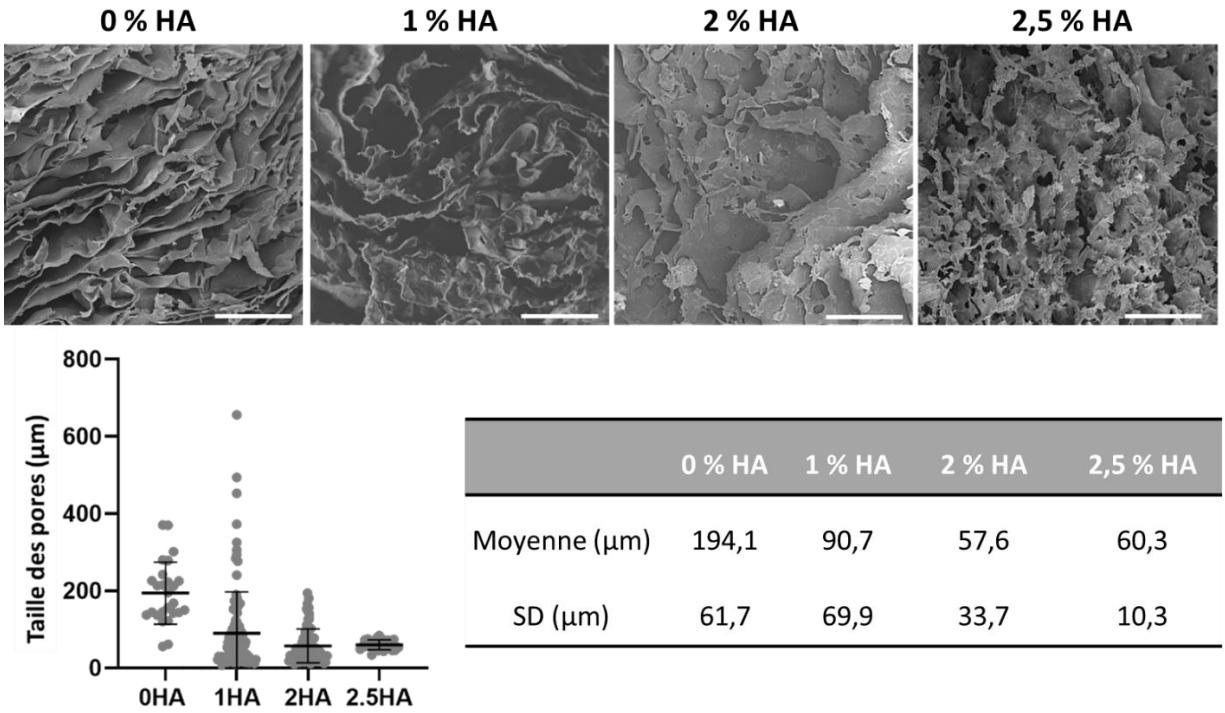
Dans le paragraphe précédent nous avons déterminé les paramètres de formulation des matrices composites en conditions déshydratées. Notre objectif est maintenant de caractériser ces mêmes matrices après hydratation pour mimer les conditions d'utilisation *in vivo.*

4.1. Porosité des matrices hydratées.

La structure des hydrogels a été observée par cryo-microscopie électronique à balayage ou cryo-MEB à partir des matrices composites hydratées dans de l'eau milliQ (Figure 15). La porosité externe et interne a été observée.

Les polypeptides semblent s'organiser en feuillets empilés, ceci est particulièrement visible pour les gels sans HA ou contenant de faibles concentrations d'HA (1 %).

Lorsque la concentration en HA augmente, la structure en feuillet devient moins visible.



	0 % HA	1 % HA	2 % HA	2,5 % HA
Moyenne (µm)	194,1	90,7	57,6	60,3
SD (µm)	61,7	69,9	33,7	10,3

Figure 15 : Observation par cryo-MEB de la structure et de la taille des pores des matrices hydratées contenant différentes concentrations en HA.

(**A**) Les matrices ont été produites à 3 % d'ELPs et peptides, en absence d'HA ou contenant 1, 2 et 2,5 % (m/v) d'HA. Le temps de réticulation des matrices est de 8 min. Les barres d'échelles indiquées correspondent à 100 µm. (**B**) Quantification de la taille des pores avec le logiciel ImageJ. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SD.

Le diamètre des pores des hydrogels a été quantifié afin de déterminer si la colonisation des matériaux par des cellules était possible.

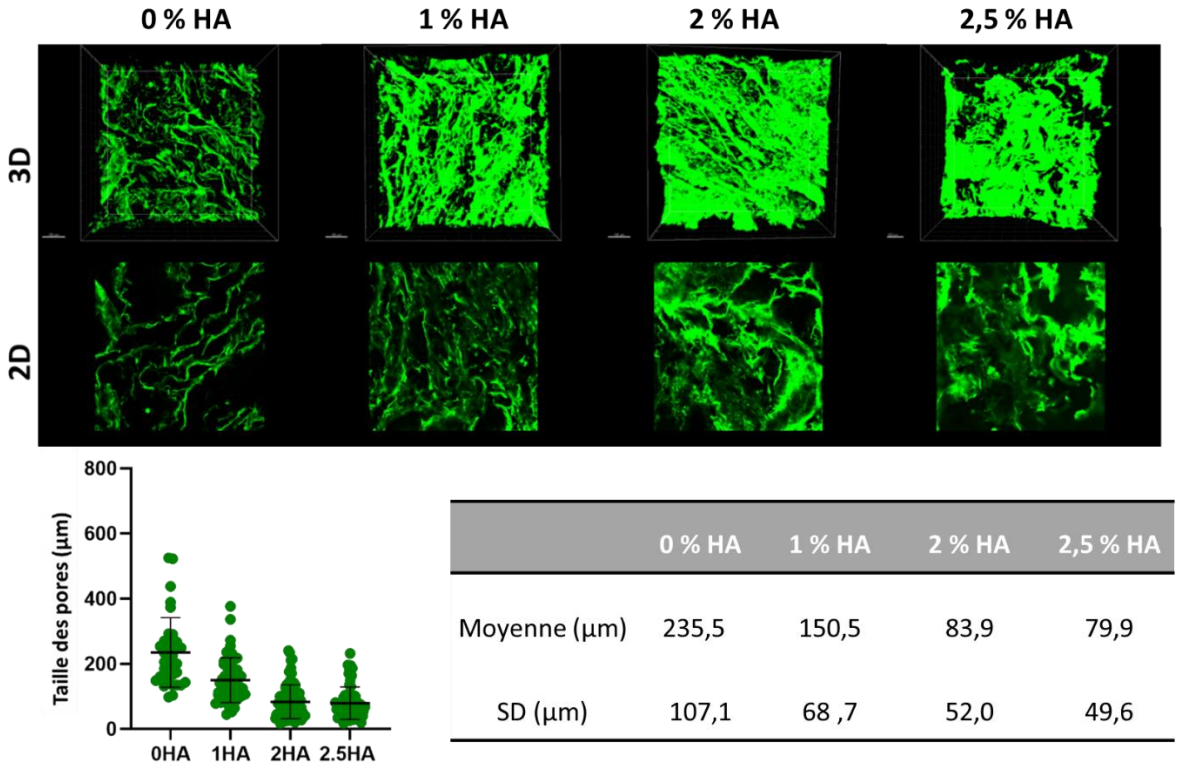
Les diamètres des pores mesurés sont de 194 +/- 62 µm pour les hydrogels 0 % HA ; 90 +/- 70 µm pour les gels 1 % HA ; 58 +/- 34 µm pour 2 % HA ; et 60 +/- 10 µm pour 2,5 % HA.

De façon attendue, la taille des pores est plus grande pour toutes les formulations après hydratation. La taille des pores diminue avec l'augmentation de la concentration en HA, ce qui indique que la présence des particules d'HA modifie le gonflement des pores et rend probablement le matériau plus rigide. Cependant, pour toutes les formulations les pores des matrices composites ont un diamètre suffisant pour permettre la colonisation cellulaire (Marrella *et al*. 2018).

4.2. Interconnexion des pores.

Bien que ces matrices soient poreuses, une colonisation cellulaire des matériaux n'est possible que si les pores sont interconnectés. Pour démontrer l'interconnectivité des pores, les hydrogels ont été immergés dans une solution de FITC-Dextrane, puis la diffusion de cette molécule fluorescente a été observée par microscopie confocale sur une hauteur de 500 µm (Figure 16). Nous avons observé une diffusion de la molécule fluorescente dans tous les hydrogels, ce qui indique que les pores sont bien

interconnectés. Une quantification de la taille des pores a permis de confirmer les résultats précédemment obtenus par cryo-MEB, avec notamment une relation inverse entre leur taille et la concentration en particules d'HA.



	0 % HA	1 % HA	2 % HA	2,5 % HA
Moyenne (µm)	235,5	150,5	83,9	79,9
SD (µm)	107,1	68 ,7	52,0	49,6

Figure 16 : Diffusion de fluorescence et quantification de la taille des pores des matrices contenant différentes concentrations en HA.

Les matrices 3 % d'ELP + peptides contenant 0, 1, 2 et 2,5 % (m/v) d'HA ont été incubées pendant 15 min en présence de 1 µM de solution de FITC-Dextrane 70 kDa. Des acquisitions au microscope confocal ont été réalisées tous les 5 µm sur une hauteur totale de 500 µm. Les images 3D correspondent à la superposition de toutes les acquisitions 2D. La quantification des pores a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ sur les images 2D.

4.3. Intérêt du peptide SNA15 dans la rétention et la distribution des particules d'hydroxyapatite.

Le peptide de nucléation du phosphate de calcium SNA15, de séquence CβA-DDDEEKFLRRIGRFG-βAC, est dérivé de la protéine salivaire statherine. Il a été utilisé pour son rôle supposé dans la rétention des particules phosphocalciques (Johnsson *et al*. 1991; Schlesinger *et al*. 2009).

Des hydrogels composites contenant ou non ce peptide SNA15 ont été produits avec la même concentration en matrice ELPs et en faisant varier les concentrations en HA de 0 %, à 2,5 %.

Une analyse *Energy Dispersive X-Ray* (EDX) a été réalisée afin de déterminer la composition élémentaire de surface des matériaux, et plus particulièrement l'élément calcium (identifiés sous forme de points blancs dans la Figure 17). On peut voir que les gels sans HA contiennent peu ou pas

de calcium. Comme attendu, plus les gels sont supplémentés en particules d'HA, plus le signal augmente. Ce phénomène est d'autant plus visible lorsque les gels contiennent le peptide SNA15.

L'analyse quantitative montre que le pourcentage atomique de calcium dans les gels contenant du SNA15 est plus important que ceux qui n'en contiennent pas : par rapport aux gels ne contenant pas le peptide SNA15, il y a 8 fois plus de calcium dans les gels 1 % HA + SNA15, 8.9 fois plus dans les gels 2 % HA + SNA15 et 12.6 fois plus dans les gels 2,5 % HA + SNA15.

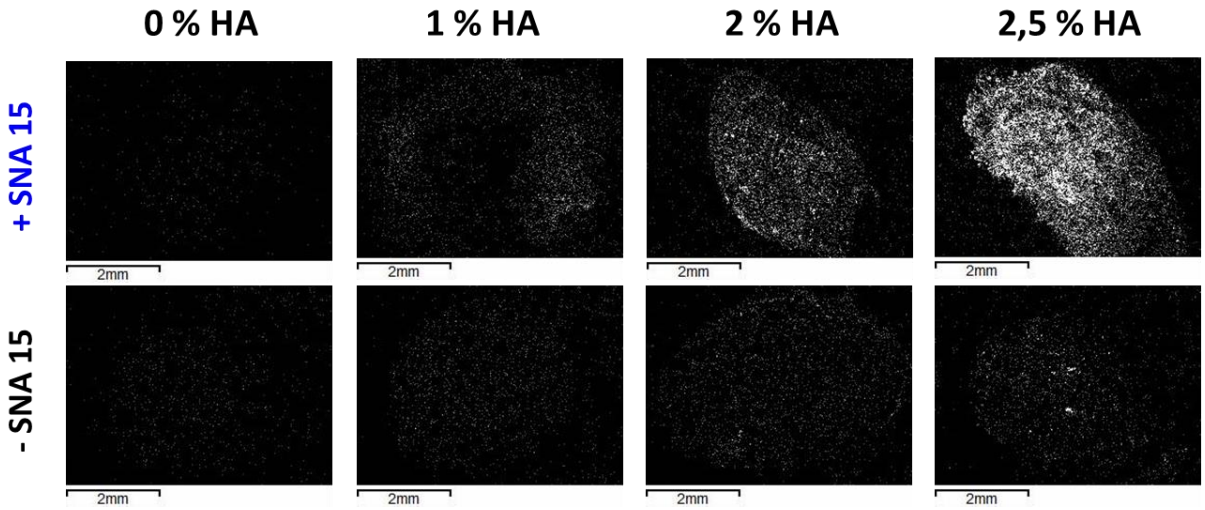


Figure 17 : Microscopie électronique à balayage couplée à l'analyse EDX sur des matrices ELPs + peptides IKVAV/YIGSR contenant ou non le peptide SNA 15.

Les matrices ELPs + peptides IKVAV / YIGSR contenant 0, 1, 2 et 2,5 % d'HA contenant ou non le peptide SNA 15 ont été lyophilisées et coupées en 2. L'intérieur des matrices coupées a été analysé. Le signal sous forme de points blancs correspond aux particules de calcium constituant l'hydroxyapatite. Les barres indiquées sur la figure correspondent à 2 mm.

On peut conclure que le peptide SNA15 joue un rôle majeur dans la rétention des particules de phosphate de calcium puisqu'elles sont entre 8 et 12.6 plus nombreuses en sa présence. Ceci est surement dû à la présence dans ce peptide d'acides aminés acides comme l'acide glutamique (E) et l'acide aspartique (D). En effet, leur pKa étant respectivement de de 4.1 et 3.9, ils vont pouvoir lier en condition physiologique les ions calciums par interaction électrostatique.

V. Conclusion.

Nous avons ainsi produit une matrice composite, composée pour sa partie organique d'ELP M80-alcène, de peptides biomimétiques contenant les séquences d'adhésion IKVAV, YIGSR, le motif de coupure protéolytique PVGLIG, ainsi que le peptide de nucléation du calcium SNA15, et pour sa phase minérale des microparticules d'hydroxyapatite.

Si nous résumons les différentes étapes du développement de cette nouvelle matrice composite :

- Dans le Chapitre 1, après avoir synthétisé le polypeptide ELP M80, nous l'avons chimiquement modifié pour obtenir les polymères ELP M80-alcène puis d.ELP M80-alcène. Le choix du polymère constitutif des hydrogels s'est porté sur l'ELP M80-alcène qui n'a montré aucune cytotoxicité contrairement au d.ELP M80-alcène.
- Nous avons introduit une phase minérale dans les matrices d'ELPs afin de mimer la nature du tissu osseux. Des particules d'HA ont été synthétisées par précipitation chimique humide avec un rapport P/Ca de 1,67 (Figure S1). La synthèse d'HA a donné lieu à des composés purs d'un diamètre hydrodynamique d'environ 1,77 µm, leur taille micrométrique les rendant compatibles avec des applications biomédicales.
- La réticulation de ces matrices a été optimisée en utilisant 8 min de temps d'irradiation UV, avec un rapport équimolaire entre les alcènes et les thiols, une concentration finale de 3 % en ELP M80 et peptides, et une concentration maximale en particules d'HA de 2,5 %.
- L'intérêt du peptide SNA15 pour la rétention et la distribution homogène des particules d'HA dans les gels a été démontré. En présence de ce peptide, environ 10 fois plus de particules d'HA sont retrouvées dans nos matrices, ce qui pourrait avoir un effet bénéfique sur les propriétés ostéoconductrices, voire ostéoinductrices, de nos hydrogels composites.
- Nous avons montré que la taille des pores variait de 194 +/- 62 µm dans les matrices sans HA à 60 +/- 10 µm dans les matrices contenant 2,5 % d'HA, indiquant que la présence d'HA modifie la structure des matrices et plus particulièrement la taille des pores. Toutefois, dans le cas de cette dernière formulation, la taille des pores reste suffisante pour permettre la colonisation cellulaire, d'autant plus que nous avons montré que ces pores étaient interconnectés.
- La prochaine étape de ce travail sera d'évaluer *in vitro* la réponse des cellules d'intérêt en l'ingénierie tissulaire (Chapitre 3) avant d'évaluer la capacité de régénération osseuse de ces matrices composites à base d'ELPs, à l'aide de modèles expérimentaux *in vivo* (Chapitre 4).

VI. Annexes.

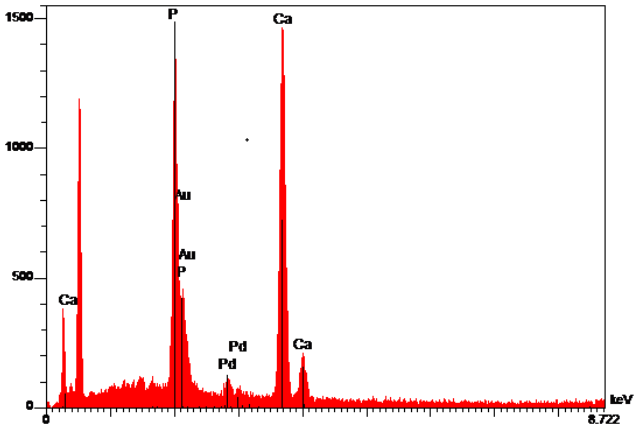


Figure S1 : Analyse EDX de la composition chimique des poudres d'HA.

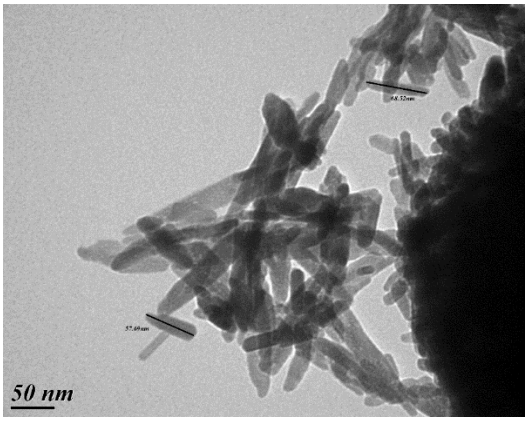


Figure S2 : Particules d'HA en Microscopie électronique à transmission (Ehret *et al.* 2017).

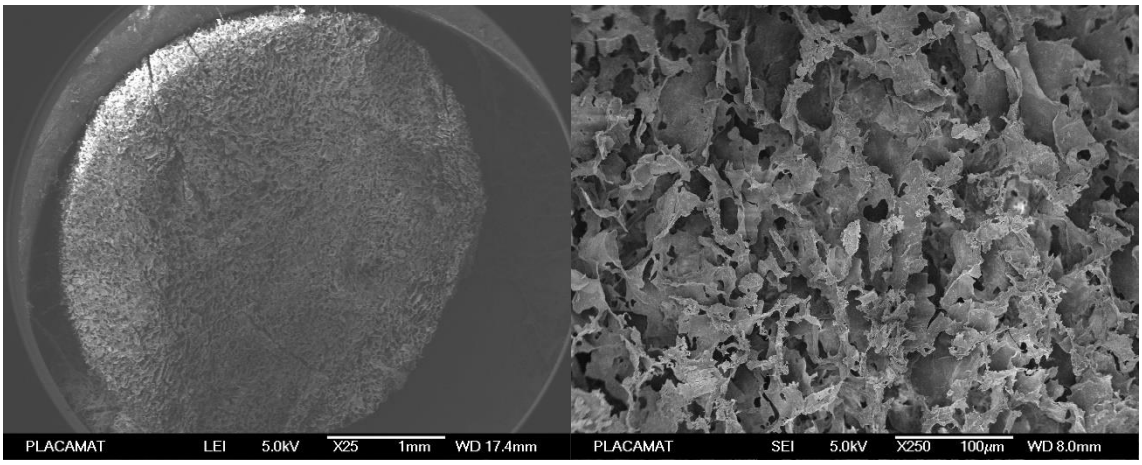


Figure S3 : Structure de la matrice à 3 % d'ELP et peptide contenant 2,5 % de HA en cryo-MEB.

Chapitre 3 :

Évaluation *in vitro* de la matrice composite à base d'ELPs.

I. Introduction.

Le développement de matrices tridimensionnelles (3D) a pour premier objectif de fournir un microenvironnement favorable à l'adhésion, à la prolifération et à la migration cellulaire, en facilitant les échanges de nutriments et de molécules de signalisation. Ces échanges sont possibles si la matrice est constituée de pores interconnectés. Cette porosité et cette interconnectivité contribuent à l'invasion vasculaire qui est un facteur important dans la régénération osseuse. Cependant, si la présence de pores interconnectés est bénéfique pour la diffusion des nutriments et de l'oxygène, la porosité peut réduire les propriétés mécaniques du matériau, ce qui peut poser un problème lors de son implantation dans les sites osseux qui subissent de fortes contraintes mécaniques (Gerecht *et al*. 2007).

Les matrices ont également pour rôle de servir de structures 3D à la régénération osseuse en mimant au mieux la MEC osseuse et en stimulant l'ostéogénèse. La présence de protéines de la matrice extracellulaire dans la composition de ces nouveaux biomatériaux constitue une stratégie de développement de matrices 3D. La revue de la littérature a permis également de montrer que des peptides issus de ces protéines matricielles pouvaient jouer un rôle similaire, dès lors que leur mode de greffage et/ou de fonctionnalisation étaient contrôlés.

Nous avons développé un matériau composite constitué d'ELPs, de peptides (IKVAV/YIGSR et SNA15), et d'HA (Chapitre 2). Avant implantation chez le petit animal, des études *in vitro* sont nécessaires pour évaluer la biocompatibilité de notre matrice.

Dans ce contexte, notre objectif est d'évaluer le comportement de trois types cellulaires en présence de notre matrice composite à base d'ELPs. Ces trois types cellulaires sont :

- Les cellules souches mésenchymateuse (MSCs), pour lesquelles nous avons fait des études de survie, de prolifération cellulaire, et de différenciation en cellules osseuses (cytochimie de la phosphatase alcaline ALP)
- Les cellules endothéliales (ECs) pour lesquelles nous avons étudié la viabilité ainsi que leur capacité à former des réseaux dans la matrice (angiogenèse)
- Les neurones sensoriels (NS) pour analyser l'ancrage des neurones sensoriels et la croissance des neurites.

Deux autres questions se sont posées :

- Le peptide IKVAV/YIGSR a-t-il une influence sur l'adhésion et le devenir des cellules d'intérêt ?
- La concentration en particules d'HA peut-elle avoir un effet sur la distribution et la prolifération et l'activité des cellules ?

II. Matériels et méthodes.

2.1. Production des matrices.

Comme déterminé dans le chapitre précédent, les matrices ont été produites avec un rapport équimolaire de thiol et d'alcène, en utilisant 50 % d'ELPs M80-alcène comme squelette polypeptidique et 2 peptides contenant des thiols à leurs extrémités.

- Le premier peptide, nommé IKVAV/YIGSR, est composé de ces deux motifs dérivés de la laminine et du site protéolytique PVGLIG (clivage par MMP2). La séquence complète est CβA-**IKVAV**-GGG-PVGLIG-GGG-**YIGSR**-βAC. Le groupe thiol présent dans les cystéines permet la réticulation avec les alcènes des ELPs M80-alcène.
- Le second peptide est appelé SNA15, de séquence CβA-**DDDEEKFLRRIGRFG**-βAC. Il s'agit d'un peptide de nucléation du phosphate de calcium dérivé de la protéine salivaire statherine qui favorise la distribution des particules de HA dans les matrices.

La réticulation a été réalisée à l'aide du photoinitiateur Irgacur® 2959 (Sigma-Aldrich®) (0,05 % m/v) sous exposition aux UV (λ = 305 nm) pendant 8 min (voir Chapitre 2). Les matrices ont été préparées dans des moules en PDMS (Sylgard® 184).

Des matrices 3 % (m/v) ont été produites en absence de particules de HA (0 % HA) ou en faisant varier la concentration en HA à 1 %, 2 % et 2,5 % (m/v) (Figure 1).

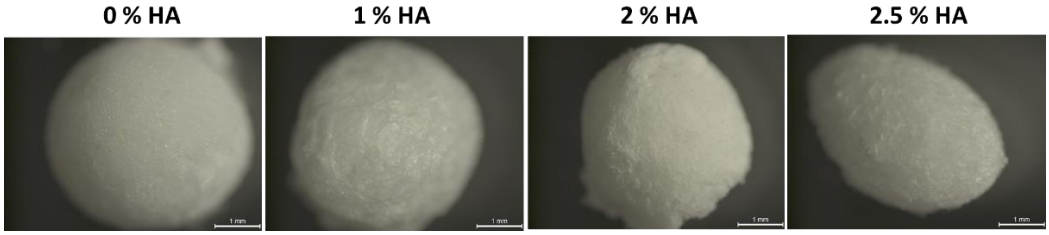


Figure 1 : Matériaux à base d'ELPs, modifiés par les peptides IKVAV/YIGSR et SNA15 et supplémentés par différentes concentrations de particules d'hydroxyapatite (HA).

2.2. Isolement des cellules et cultures cellulaires.

2.2.1. Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse de Rat (MSCs).

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (MSCs) ont été isolées à partir de rats Wistar âgées de 4 à 8 semaines. Afin d'exposer la moelle osseuse, le fémur et le tibia ont été prélevés puis coupés aux extrémités. Ensuite, les os ont été transférés dans des tubes de 1,5 ml et centrifugés à 1500 × g pendant 30 secondes pour rincer la moelle osseuse. Le culot obtenu a été remis en suspension dans du milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant 1 g/L de glucose, 1 % (v/v) de Pénicilline/Streptomycine (PS), et 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (FBS). Les cellules ont été

individualisées par 4-6 passages à travers des aiguilles de 16 G et 21 G. Le contenu cellulaire obtenu à partir des fémurs de rats (3 rats) a ensuite été ensemencé dans un flacon de 75 cm^2 avec du milieu DMEM 1 g/L de glucose, 1 % PS et 10 % FBS puis placé dans un incubateur humidifié à 37 °C et 5 % CO_2. Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine pour éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes ont été cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent 90 % de confluence, avant d'être amplifiées. Ces cellules ont été amplifiées jusqu'au passage 3, puis elles ont été ensemencées dans les matrices.

100 000 MSCs ont été ensemencées sur les hydrogels préalablement disposés dans une plaque de 24 puits. Leur différenciation vers la lignée ostéoblastique a été initiée à l'aide du kit de différenciation de l'ostéogenèse StemPro® (Gibco # A10072-01). Les plaques ont ensuite été placées dans un incubateur à 37 °C avec 5 % CO_2, et le milieu a été changé tous les 3 à 4 jours.

2.2.2. Cellules endothéliales (ECs).

Les cellules endothéliales (ECs) dérivées de la moelle osseuse de Rat ont été obtenues auprès de Cell Biologics® (Référence RA-6221). Les ECs ont été cultivées dans le milieu de croissance des cellules endothéliales-2 (EGM-2, Clonetics® LONZA®) et incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée avec 5 % de CO_2. Les cellules ont été cultivées jusqu'à 90 % de confluence avant d'être trypsinisées. Les cellules issues du passage 3 (P3) et 4 (P4) ont été infectées par un lentivirus contenant le gène de la protéine fluorescente rouge (RFP)-Vectalys. Les ECs ont été cultivées jusqu'au passage 7 puis ensemencées à une densité cellulaire de 200 000 cellules par matrice.

2.2.3. Neurones sensoriels (NS) issus des ganglions de la racine dorsale de Rat (DRG).

Les neurones sensoriels primaires ont été obtenus à partir des ganglions de la racine dorsale (DRG) de rats Wistar âgées de 6 semaines (Malin *et al*. 2007). Après sacrifice, la colonne vertébrale a été retirée et placée dans 10 mL de Hank's Balanced Salt Solution ou HbSS (Gibco®) contenant 1 % (v/v) de PS. Les colonnes vertébrales ont été gardées sur glace jusqu'au retrait des ganglions. L'excès de tissu environnant a été enlevé sous hotte à flux laminaire, et une coupe de la partie caudale vers la partie rostrale a été faite pour exposer les DRGs. Les ganglions ont été prélevés individuellement et placés dans du milieu DMEM pauvre en glucose. Ensuite, les corps cellulaires ont été séparés des neurites à l'aide d'un scalpel, puis les explants de DRG ont été digérés dans un milieu de DMEM 1 g/L de glucose (Gibco®) avec 2800 U/mL de collagénase Type IV (Gibco®) pendant 1 h à 37 °C. La solution a été mélangée avec une micropipette après une demi-heure d'incubation, puis elle a été lavée deux fois par centrifugation avec du DMEM 1 g/L de glucose.

Les neurones sensoriels issus de cet isolement cellulaire ont été ensemencés à la densité de 2 000 NS par matrice, et cultivés dans une solution de DMEM contenant 4.5 g/L de glucose (Gibco®) supplémenté avec 2 % (v/v) de B-27 Serum-Free (B-27 Gibco®), 1 % (v/v) PS (Gibco®) et 1 % (v/v) de FBS (PAN™ Biotech®). Les cultures ont été maintenues pendant 7 jours.

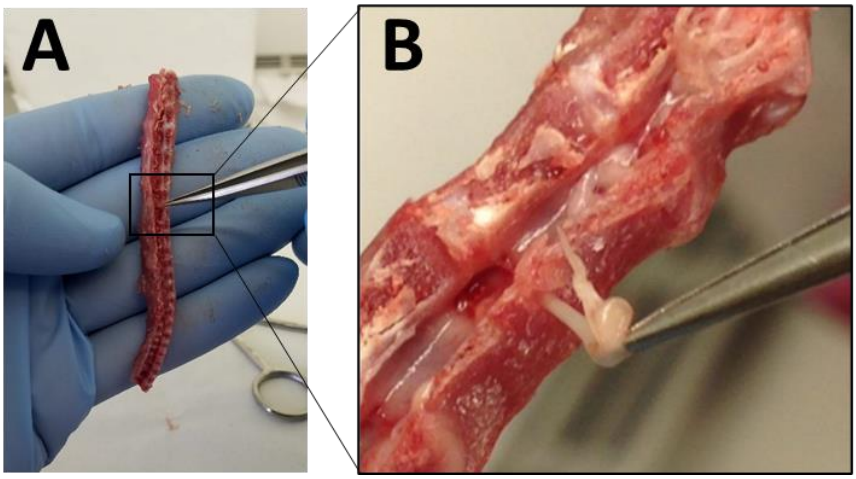


Figure 2 : Isolements des ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière de rat.
Après sacrifice, les rats sont ouverts au niveau dorsal, la moelle épinière est retirée puis coupée en deux (**A**) ce qui permet d'isoler individuellement les DRG (**B**).

2.3. Test d'activité métabolique.

L'activité métabolique cellulaire des MSCs et des ECs a été étudiée par un test Alamar Blue. Ce test repose sur la mesure de la dégradation de la molécule de Résazurine, qui est un réactif de couleur bleu non fluorescent se transformant en un réactif rouge fluorescent après sa réduction en Résofurine. Cette réduction par le NADH reflète le métabolisme cellulaire puisqu'elle est catalysée par les réductases mitochondriales et cytoplasmiques. Les données obtenues ont également été utilisées pour quantifier la prolifération cellulaire.

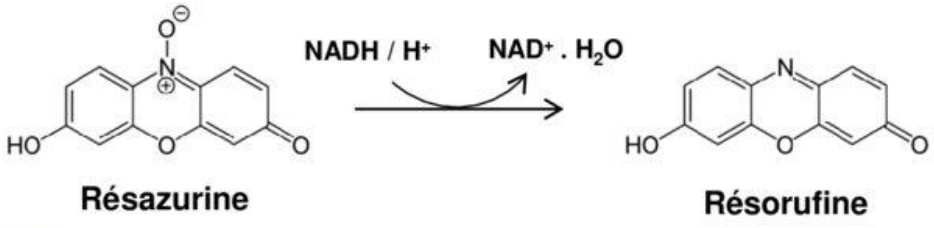


Figure 3 : Réaction de réduction de la Résazurine en Résofurine.

Le milieu de culture a été retiré et remplacé par du milieu supplémenté avec 10 µg/mL Alamar Blue (Sigma-Aldrich®). Après 2 h d'incubation à 37 °C, le milieu est prélevé pour une lecture de l'absorbance à 550 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Victor X3 2030 Perkin Elmer).

2.4. Test de viabilité cellulaire et de cytotoxicité.

La viabilité cellulaire des MSCs a été évaluée par un test de Live/Dead™ Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen® #L3224) après 1 jour et 7 jours d'ensemencement. Ce test est basé sur une reconnaissance visuelle simple de la viabilité cellulaire : les cellules vivantes apparaissent en vert alors que les cellules mortes apparaissent en rouge. Brièvement, le colorant non fluorescent acétoxyméthyl calcéine (AM) est transformé par l'activité estérase intracellulaire des cellules vivantes en calcéine fluorescente (verte). Pour les cellules mortes l'homodimère-1 d'éthidium rouge fluorescent pénètre dans les cellules dont les membranes plasmiques ont été lysées et va se lier à l'ADN double brin.

La solution de Live/Dead® a été préparée selon les recommandations du fabriquant. L'activation de la solution Live/Dead® a été réalisée à 37 °C pendant 15 min à l'abri de la lumière. Les matrices supplémentées en cellules ont été incubées avec la solution de Live/Dead® pendant 15 min à 37 °C. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide du microscope confocal (Leica TCS SPE 5 DMI 4000B).

2.5. Test d'activité de la phosphatase alcaline.

L'activité de la phosphatase alcaline (ALP) est corrélée à la différentiation ostéoblastique. La cytochimie de la phosphatase alcaline a été réalisée à l'aide du kit Leukocyte Alkaline Phosphatase (Sigma #86R-1KT) en suivant les recommandations du fournisseur.

Brièvement, après 1 et 7 jours de culture, les MSCs ont été fixées dans les matrices pendant 20 min à température ambiante en utilisant du PFA 4 % (Antigenfix®). Les matrices ont ensuite été lavées deux fois à température ambiante dans du PBS avant ajout du substrat de l'enzyme selon les instructions du kit. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire (Leica®, MZ10F) pour quantifier les produits de réaction de l'ALP.

2.6. Immunocytofluorescence des marqueurs des NS.

Les NS cultivés sur les matrices ont été fixés avec du PFA à 4 % pH 7.4 (Antigenfix®) pendant 45 min. Après lavage au PBS, les cellules ont été incubées dans un tampon de perméabilisation (0,5 % Triton X-100 dilué dans PBS 1X (Gibco®)) pendant 30 min à température ambiante. Les sites aspécifiques ont été saturés avec de la sérum albumine bovine (BSA) 1 % pendant 45 min à température ambiante.

Les matrices contenant les NS ont été incubées pendant une nuit à 4 °C avec des anticorps primaires anti-β III tubuline (Abcam, ab 18207) dilués au 1 :1000ème dans le tampon de blocage (0,1 % Triton X-100 et 10 % de sérum d'âne dans du PBS). Trois lavages successifs avec du PBS ont été réalisés. L'anticorps secondaire fluorescent Alexa fluor® 568 (A10042_lot 2306809) a été ajouté pendant 1 h à température ambiante. Toutes les matrices ont été incubées pendant 20 min à température ambiante

avec du DAPI dilué au 1 :1000ème (Thermo Scientific™, Allemagne) pour marquer les noyaux cellulaires.

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (SP8, Leica Microsystems) équipé d'un objectif 20X. La quantification de la longueur des neurites a été réalisée avec le logiciel Imaris® et le plugin Filament.

III. Résultats et Discussion.

La réponse des trois types cellulaires (MSCs, ECs et NS) a été analysée pendant 7 jours après l'ensemencement sur nos matrices.

Deux principales questions se sont posées : (i) le peptide IKVAV/ YIGSR a-t-il une influence sur la survie et l'activité métabolique des cellules mésenchymateuses, neuronales et endothéliales ; (ii) la présence d'HA dans les matrices modifie t'elle la survie et l'activité des cellules. En effet l'HA est un composé phosphocalcique chargé, ce qui peut avoir une influence sur la physiologie cellulaire.

3.1. Activité métabolique et viabilité cellulaire des MSCs.

La prolifération des MSCs sur les matrices a été étudiée en mesurant l'activité métabolique (test de l'Alamar Blue) après 1, 4 et 7 jours de culture (Figure 4A). Aucune différence significative n'a été observée entre les gels contenant 0 %, 1 % et 2 % d'HA, que ce soit en absence ou en présence du peptide IKVAV/YIGSR. En revanche, une diminution significative de l'activité métabolique des MSCs a été observée après 4 jours de culture sur les matrices composées de 2,5 % d'HA et du peptide IKVAV/YIGSR. Cette diminution a été confirmée après 7 jours de culture.

La survie cellulaire des MSCs a été quantifiée après 7 jours de culture sur les différentes formulations de matrices (Figure 4B). Nous avons constaté l'adhérence des MSCs sur toutes les matrices dès les premières heures qui ont suivies l'ensemencement. Après 7 jours, la colonisation des matériaux par les MSCs a été observée sur une hauteur de 500 µm. La morphologie de type fibroblastique allongé a été retrouvée (Charbord & Casteilla 2011) pour toutes les matrices composites étudiées.

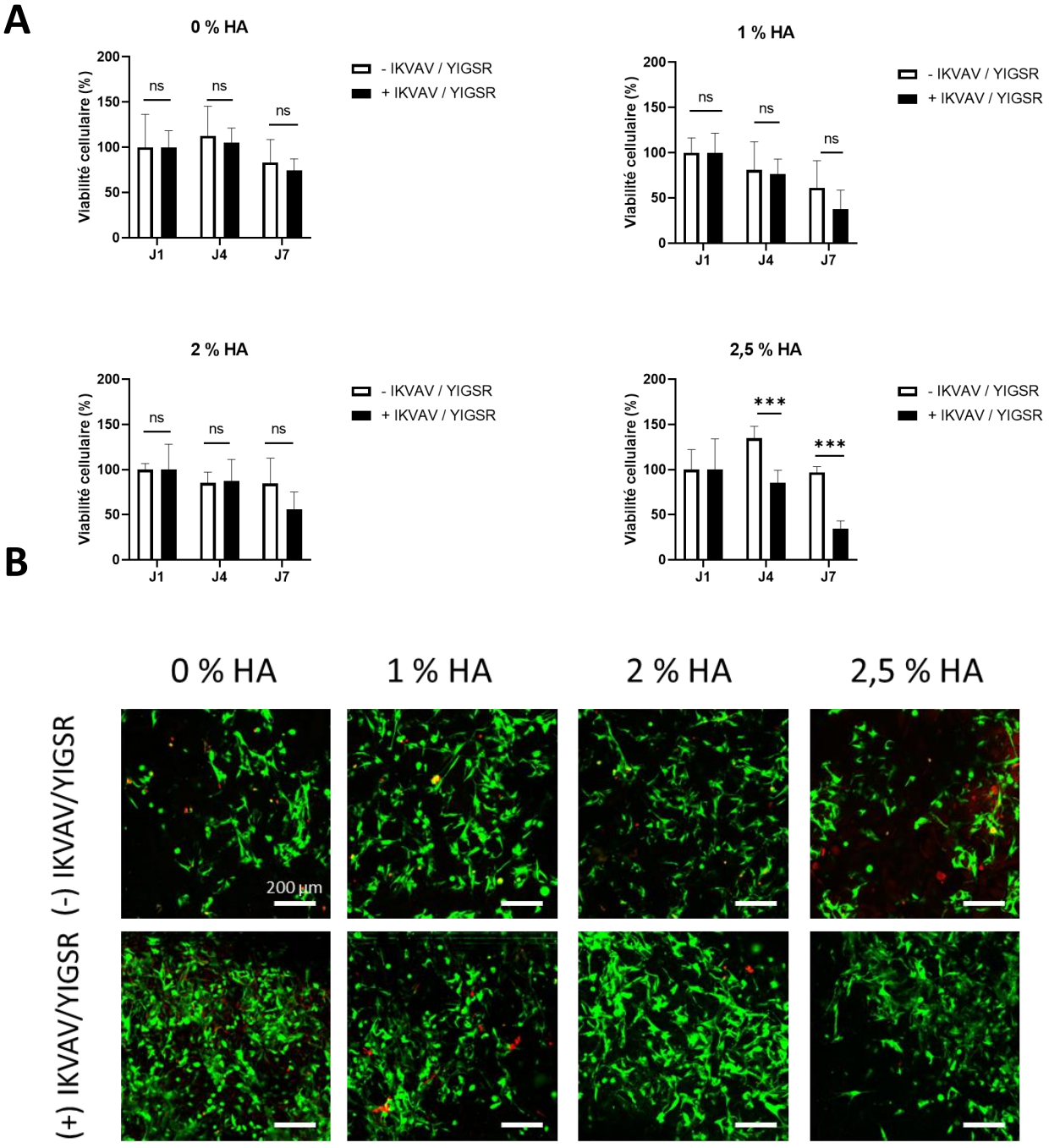


Figure 4 : Viabilité cellulaire des MSCs dans les matrices composites.

(**A**) L'activité métabolique des cellules MSCs a été mesurée grâce à un test Alamar Blue après 1 (J1), 4 (J4) et 7 jours (J7) de culture dans les matrices ($6 < n < 8$) contenant (+) ou non (-) le peptide IKVAV/YIGSR et différentes concentrations de particules d'HA (0 %, 1 %, 2 %, 2,5 %) . (**B**) La viabilité cellulaire pour chacune des conditions a été évaluée avec un test de Live/Dead après 7 jours de culture.

Les analyses statistiques de la variance ont été réalisées avec un test Anova suivi d'un post-test Bonferroni (ns = non significatif, p*** < 0.001). Barre = 100 µm.

Les MSCs sont donc capables d'adhérer sur toutes les matrices, et conservent une activité métabolique pendant 7 jours indépendamment de la présence du peptide IKVAV/YIGSR ou de la concentration en particules d'HA quand elle variait entre entre 0 et 2 %. En revanche, lorsqu'une concentration plus

élevée en HA de 2,5 % était utilisée, nous avons observé une diminution significative de l'activité métabolique des MSCs. Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'une quantité de charges cationiques trop élevée pour maintenir une bonne viabilité cellulaire.

3.2. Évaluation de l'activité de la phosphatase alcaline des MSCs.

La question que nous nous sommes posée concernait les capacités ostéoinductrices de la matrice composite. Pour répondre à cette question, les MSCs ont été cultivées soit dans un milieu de culture simple (DMEM supplémenté en 10 % de SFV), soit dans un milieu de culture connu pour favoriser la différenciation ostéogénique (StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit).

Lorsque les MSCs s'engagent dans la voie de différenciation ostéoblastique, elles sur-expriment la phosphatase alcaline (ALP) qui est impliquée dans la minéralisation de la matrice extracellulaire. L'activité enzymatique de l'ALP a donc été mesurée par cytochimie après 1 et 7 jours de culture en présence des différentes matrices.

Quelle que soit la composition des matrices, nous n'avons pas détecté d'activité enzymatique ALP quand les cellules étaient cultivées dans le milieu DMEM sans facteurs ostéoinducteurs (résultats non montrés).

En revanche, cette activité enzymatique a été détectée lorsque les cellules étaient cultivées pendant 7 jours dans le milieu StemPro® (Figure 5). Bien que qualitative, cette analyse de l'activité enzymatique de l'ALP montre des différences selon la composition des matrices. La présence du peptide IKVAV/YIGSR ainsi que la présence de particules d'HA semblent stimuler l'activité enzymatique ALP après 7 jours de culture. Nous pouvons notamment détecter l'activité ALP dans les MSCs cultivées sur les matrices fonctionnalisées avec le peptide IKVAV/YIGSR dès le premier jour de culture, ce qui n'est pas le cas pour les cultures des MSCs dans les matrices ne contenant pas ces deux séquences.

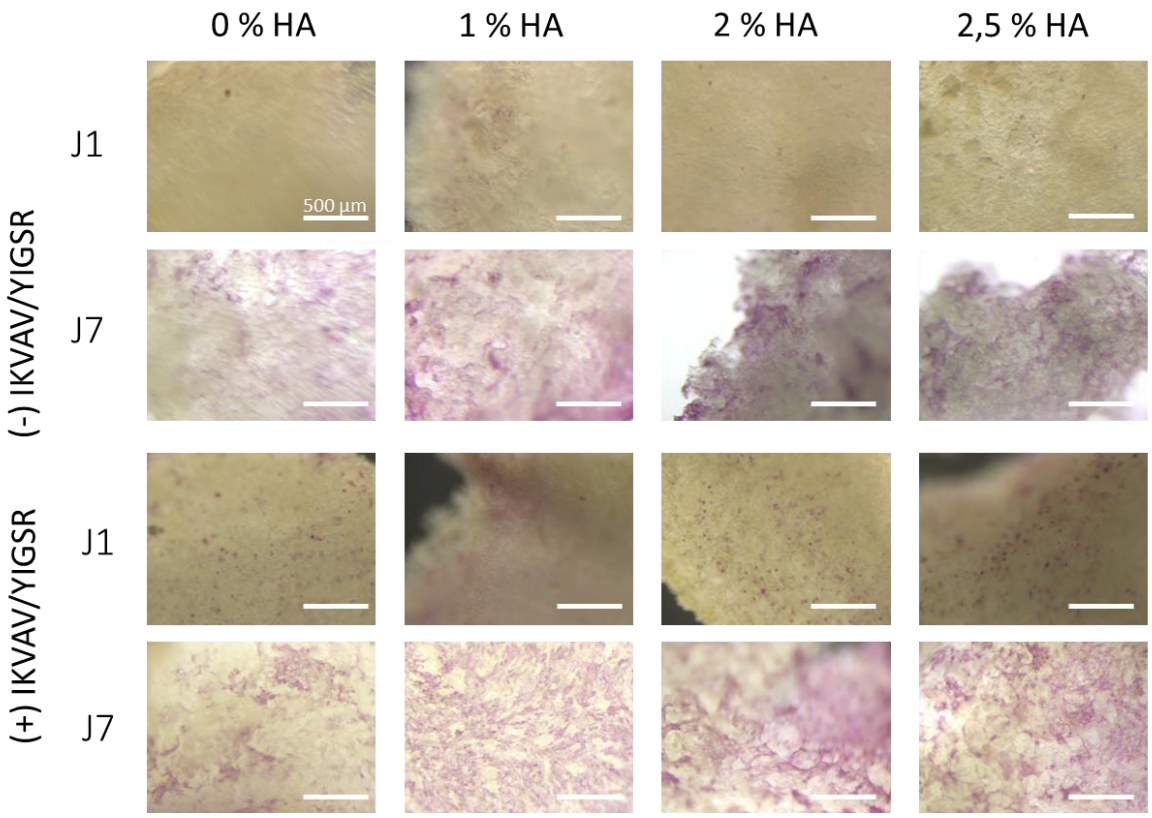


Figure 5 : Cytochimie de la phosphatase alcaline des MSCs cultivées dans les matrices composites.

La cytochimie de l'activité de la phophatase alcaline des cellules MSCs a été mesurée après 1 (J1), et 7 jours (J7) de culture dans les matrices ELPs (n=2) contenant (+) ou non (-) le peptide IKVAV/YIGSR et différentes concentrations de particules d'HA (0 %, 1 %, 2 %, 2,5 %). Les acquisitions ont été réalisées à la loupe binoculaire avec un objectif X8. Barre = 500 µm.

Pour conclure, ces résultats suggèrent que les MSCs cultivées en 3D dans nos matrices composites sont capables de maintenir une activité métabolique pendant 7 jours de culture (Figure 4). L'activité phosphatase alcaline apparait augmentée quand les cellules sont cultivées en présence des matrices contenant le peptide IKVAV/YIGSR et les particules d'HA (Figure 5).

Pour confirmer ces résultats, il faudra quantifier cette activité ALP, puis réaliser une étude de l'expression d'autres marqueurs de la différenciation ostéoblastique. En effet, les précédents travaux de notre équipe avaient montré que des hydrogels à base d'ELPs contenant le peptide IKVAV, mais dépourvus de phase minerale, permettaient de stimuler la différenciation des MSCs vers la voie ostéogenique. Des exériences de RT-QPCR avaient en effet montré une surexpression des ARNm codant les facteurs Runx2, Osx, Opn, VegfA et Bmp2 par rapport à une matrice sans peptide (Dos Santos *et al*. 2019).

Nous avons essayé de réitérer ces expériences avec nos matrices sans succès. Le problème principal réside dans notre incapacité à purifier des quantités suffisantes d'ARN à partir des cultures cellulaires,

et ce quel que soit le protocole de purification utilisé. Nous pensons que ces échecs sont la résultante de deux problèmes. Le premier tient à la difficulté à homogénéiser le matériel dans le tampon de lyse. En raison de la nature poreuse du matériau, les cellules sont présentes à la surface mais également à l'intérieur de l'hydrogel. Il y a donc une difficulté à broyer efficacement le matériel pour libérer tous les constituants cellulaires qu'il contient. Le second problème, qui selon nous est le plus important, tient à la présence de particules d'HA dans nos matrices. Ces particules étant chargées positivement, elles forment des liaisons electrostatiques avec les molécules d'acides nucléiques (ADN et ARN) qui sont libérées lors de l'étape de lyse cellulaire. Visiblement, ces liaisons sont suffisament importantes pour empêcher la purification efficace des molécules d'ARN.

Pour pallier ce problème, nous envisageons dans le futur, soit d'augmenter le nombre de cellules ensemencées par hydrogel, soit d'ajouter un polyanion avant l'étape de lyse pour saturer les charges positives de l'HA et ainsi éviter l'adsorption des ARNs.

3.3. Prolifération des cellules endothéliales.

L'activité métabolique des ECs cultivées sur les matrices composites a été évaluée par le test de l'Alamar Blue (Figure 6A) en fonction du temps de culture (J1, J4, J7). Le nombre de cellules ECs ensemencées dans les différentes formulations de matrices était identique à celui précédemment utilisé pour les MSCs.

Comparativement à l'activité des MSCs, nous avons observé une augmentation significative de l'activité métabolique en fonction du temps dans toutes les conditions étudiées.

Dans les matrices dépourvues de peptide IKVAV/YIGSR, l'activité métabolique était similaire après 4 jours de culture quelle que soit la concentration en HA.

La différence était plus importante après 7 jours de culture : l'activité métabolique des ECs était significativement plus élevée dans les matériaux sans HA que dans ceux qui en contenaient 1 ou 2 %. Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution car les matrices ne contenant pas le peptide IKVAV/YIGSR ont commencé à se déliter après 4 jours de culture, rendant difficile leur analyse.

Dans les matrices contenant le peptide IKVAV/YIGSR, les ECs ont semblé proliférer moins rapidement après 4 jours de culture que dans les matrices sans peptide. Cette différence est surtout visible quand on compare les résultats obtenus avec les cultures témoins en 2D. De plus, l'activité métabolique des ECs cultivées sur les matrices contenant le peptide est significativement plus faible que celle mesurée en absence de peptide. Seule la condition matrice + peptide IKVAV/YIGSR + 2 % HA semble augmenter l'activité métabolique des ECs.

Après 7 jours de culture, l'activité métabolique des ECs cultivées dans les matrices composites avec ou sans peptide etait relativement similaire. Là encore, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le composite contenant 2 % d'HA.

Ces résultats suggèrent donc que la présence du peptide IKVAV/YIGSR ralenti la prolifération des ECs. À J4, la quantité de cellules a été multipliée par un facteur 4-5 dans les matrices sans peptide, mais seulement par un facteur 2 dans celles qui en contiennent.

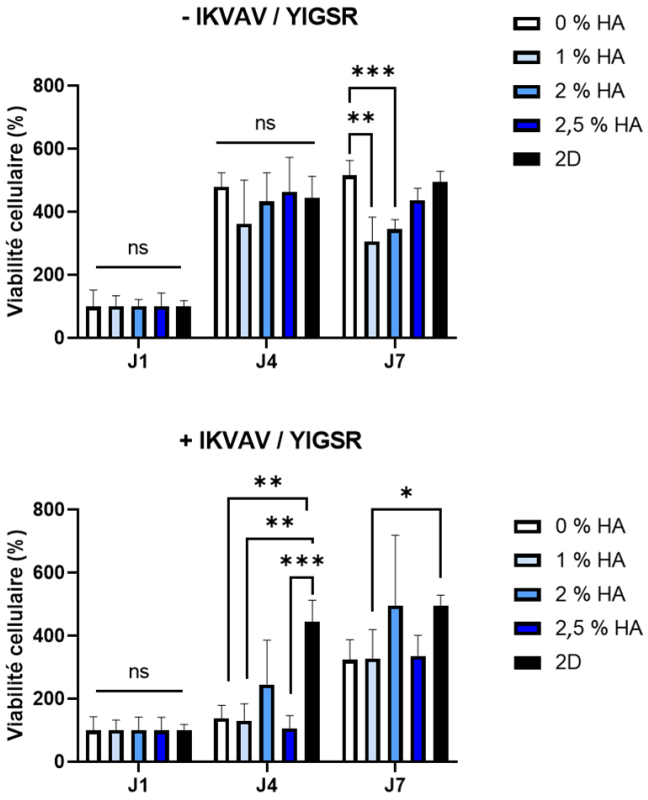
En revanche, après 7 jours de culture l'activité métabolique est similaire à celle mesurée à J4 pour les matrices sans peptide, alors qu'elle a été multipliée par un facteur 2 pour les matrices IKVAV/YIGSR. La présence du peptide diminue donc la vitesse de prolifération cellulaire, mais n'est pas vraiment délétère puisque les activités métaboliques mesurées à 7 jours étaient relativement similaires entre les matrices contenant ou pas les séquences IKVAV/YIGSR.

Quant à l'effet de l'HA sur les ECs, dans les matrices sans peptides, la présence de 1 % d'HA semble diminuer l'activité métabolique après 7 jours de culture par rapport à une matrice sans HA. En revanche, l'augmentation de la concentration à 2,5 % d'HA augmente l'activité métabolique chez les mêmes cellules. Nous n'avons pas d'explication pour ces résultats contradictoires. D'autre part, la concentration en HA des matrices contenant le peptide IKVAV/YIGSR ne semble pas avoir une influence très importante sur l'activité métabolique des ECs. Seule la condition avec 2 % d'HA semble donner de meilleurs résultats, mais un plus grand nombre d'expériences serait nécessaire pour confirmer cette observation.

La distribution des ECs dans les différentes conditions de culture 3D et 2D a été évaluée à l'aide de cellules exprimant la protéine Red Fluorescent Protein (ECs-RFP). Les résultats montrés dans la Figure 6B montrent que les ECs étaient réparties de manière assez homogène à la surface des matrices. Nous avons cherché à savoir si les cellules pouvaient pénétrer à l'intérieur des hydrogels grâce aux pores interconnectés mais l'analyse par microscopie confocale n'a pas permis de mettre en évidence leur présence dans toute l'épaisseur de la matrice (limite à 500 µm).

Pour conclure sur ces expériences préliminaires, nos matrices composites permettaient la survie des ECs et leur prolifération. La présence du peptide IKVAV/YIGSR ne semblait pas avoir d'effet bénéfique sur l'activité métabolique des ECs. Néanmoins ces expériences n'ayant été réalisées qu'une seule fois, elles devront être répétées et complétées par une analyse quantitative des marqueurs endothéliaux avant de statuer définitivement sur le rôle du peptide IKVAV/YIGSR sur la fonction endothéliale.

A



B

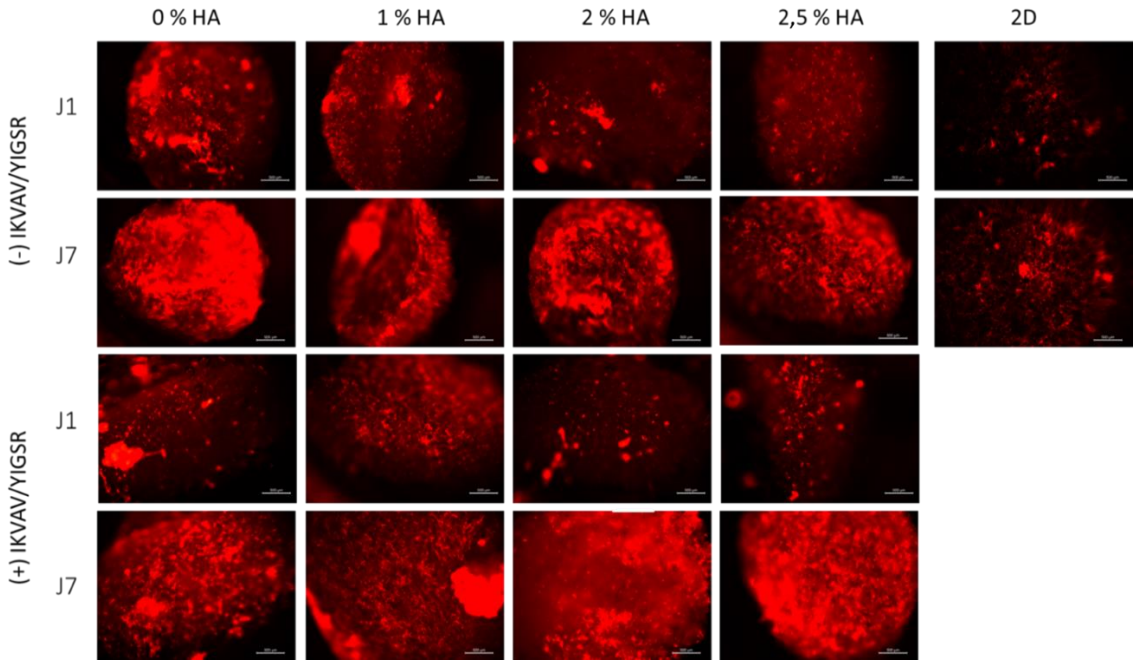


Figure 6 : Viabilité cellulaire et distribution des ECs dans les matrices composites.

(**A**) L'activité métabolique des cellules ECs ensemencées sur les matrices ELPs (n= 6-8) contenant (+) ou non (-) le peptide IKVAV/YIGSR et différentes concentrations de particules d'HA (0 %, 1 %, 2 %, 2,5 %)°a été mesurée après 1 (J1), 4 (J4) et 7 jours (J7) de culture, grâce à un test Alamar Blue. Une analyse statistique de la variance avec un test Anova suivi d'un post-test Bonferroni a été réalisé (ns = non significatif, p*** < 0.001). Barre = 500 µm. (**B**) Distribution des ECs marquées avec la proteine RFP (Red Fluorescent Protein) en fonction du temps de culture (J1 et J7) des conditions en 3D dans les différentes formulations de matrices ELPs et en 2D.

3.4. Influence du peptide IKVAV/YIGSR sur le développement des neurites.

Le développement des NS au sein des matrices contenant ou non le peptide IKVAV/YIGSR a été évalué après 7 jours de culture. Les neurites des NS ont été marqués à l'aide d'un anticorps dirigé contre la β III tubuline (Figure 7).

Pour les matrices dépourvues du peptide IKVAV/YIGSR, quelle que soit la concentration en HA, les neurites se sont peu développés. Les NS sont restés majoritairement organisés sous forme d'agrégats. À l'opposé, nous avons observé la formation de longs neurites avec toutes les matrices contenant le peptide IKVAV/YIGSR. De plus, les NS s'organisaient en réseaux.

La concentration en HA ne semblait pas avoir un effet particulier sur le développement des NS.

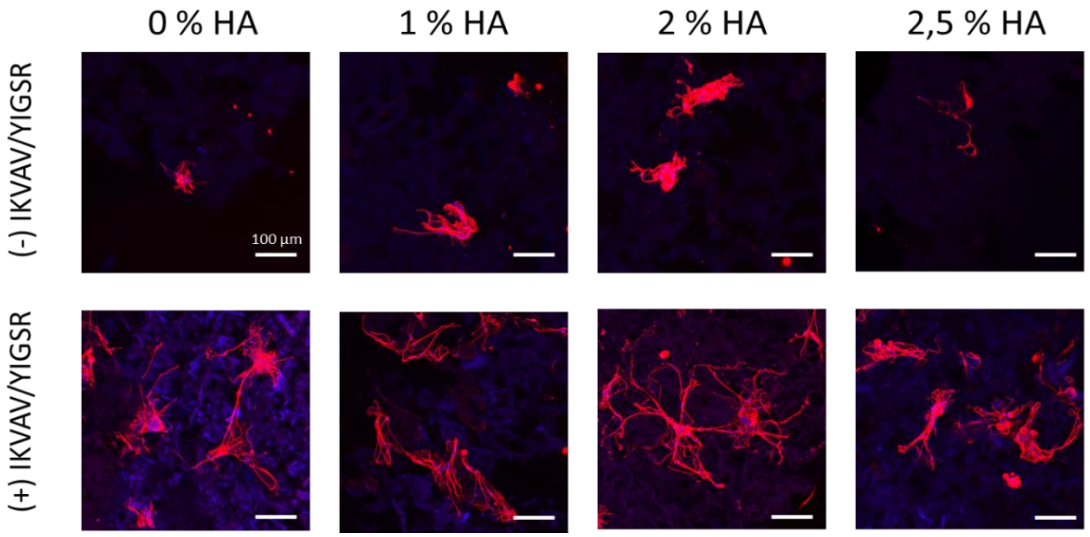


Figure 7 : Neurones sensoriels après 7 jours de culture sur les différentes matrices.

Des NS purifiés à partir des DRG de rat ont été cultivés pendant 7 jours avec les matrices d'ELPs contenant (+) ou non (-) le peptide IKVAV/YIGSR et 0 %, 1 %, 2 % et 2,5 % de particules d'HA. Un immunomarquage de la β III tubuline a été réalisé mettant en évidence les NS et la croissance des neurites. Des acquisitions au microscope confocal ont été réalisées avec un objectif 20X. La barre d'échelle = 100 µm.

Ces observations ont été confirmées par la quantification de la longueur des neurites (Figure 8). Dans les matrices qui ne contenaient pas le peptide IKVAV/YIGSR, la longueur des neurites était de 12 +/- 8 µm en absence de particules d'HA, et respectivement de 15 +/- 2 µm, 10 +/- 5 µm et 10 +/- 3 µm avec 1 %, 2 % et 2,5 % d'HA. La présence de ces particules minérales dans les hydrogels n'a donc pas d'influence sur le développement des neurites.

Cette même conclusion peut être faite dans le cas des matrices contenant le peptide IKVAV/YIGSR et des concentrations croissantes de particules de HA. La présence de HA dans les matrices ne stimule pas la croissance des neurites. Nous avons même mesuré des longueurs de neurites plus courtes en présence de 2,5 % de particules d'HA (46 +/- 7 µm) contre environ 60 µm pour les autres matrices (0 %, 1 %, 2 % d'HA). Nous pouvons faire l'hypothèse que les neurites étant de fins prolongements

neuronaux, ils peuvent être sensibles à la rugosité des matériaux. Des concentrations trop élevées en particules d'HA limiteraient donc leur croissance.

Dans les matrices contenant le peptide IKVAV/YIGSR, les valeurs mesurées après 7 jours de culture dans les hydrogels contenant le peptide étaient toujours 4 à 6 fois supérieures à celles mesurées en absence de peptide : 65 +/- 21 µm en absence d'HA, et respectivement 64 +/- 10 µm, 62 +/- 9 µm et 46 +/- 7 µm avec 1 %, 2 % et 2,5 % d'HA. Cela confirme les résultats préalablement publiés par d'autres équipes (Silva *et al*. 2004; Tashiro *et al*. 1989), ainsi que ceux obtenus par notre équipe (Dos Santos *et al*. 2019) qui avaient montré que la concentration en peptide IKVAV avait une influence sur la neurogenèse. En revanche, nous ne pouvons pas savoir si l'effet observé correspond à l'effet du peptide IKVAV seul, ou s'il existe une synergie entre les deux séquences issues de la laminine. En effet, dans la stratégie choisie pour notre étude le rapport entre les peptides IKVAV et YIGSR est constant (= 1). Pour savoir quelle est l'influence de chaque séquence, il faudrait refaire les mêmes expériences avec des matrices ne contenant que les séquences IKVAV ou YIGSR.

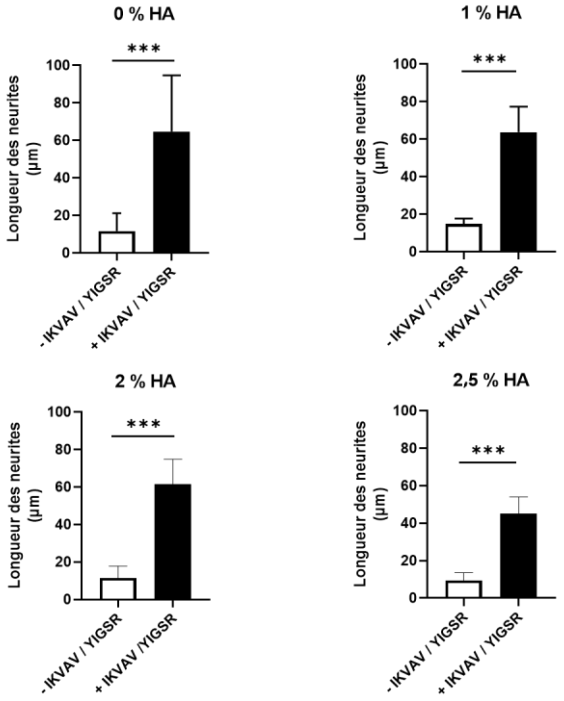


Figure 8 : Effet du peptide IKVAV/YIGSR sur la longueur des neurites des neurones sensoriels après 7 jours de culture sur les différentes matrices.

Les résultats sont présentés comme la moyenne des neurites quantifiés sur 3 acquisitions par matrice avec 3<n<6 par condition. Un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé avec le logiciel Prism (ns = non significatif et p *** < 0.001).

IV. Conclusion.

Différentes matrices à base d'ELPs ont été produites i) avec ou sans le peptide contenant les séquences IKVAV et YIGSR connues pour leurs rôles dans l'adhérence et le recrutement des cellules endothéliales

et neuronales ii) avec ou sans particules d'HA qui favorisent la formation d'une matrice extracellulaire minéralisée, l'ostéogenèse et *in fine* la formation osseuse.

La première question posée était de déterminer si ces différentes formulations avaient une incidence sur la survie, la prolifération des cellules et leur fonction. Les cellules choisies étaient les MSCs, les ECs et les NS, les données de la littérature ayant précédemment montré que ces trois types cellulaires participaient à la réparation osseuse. Nos premières expériences ont montré l'absence de cytotoxicité des différentes formulations, quel que soit le type cellulaire.

La deuxième question concernait le rôle joué par le peptide IKVAV/YIGSR sur l'activité des trois types cellulaires. La présence du peptide IKVAV/YIGSR au sein des matrices ne semble pas avoir d'effet majeur sur la prolifération et la viabilité des MSCs et des ECs. En revanche, ce peptide IKVAV/YIGSR semble essentiel à la croissance des neurites des neurones sensoriels. Le fait d'avoir développé les matrices d'ELPs avec un seul peptide contenant les deux motifs IKVAV/YIGSR ne permet pas toutefois progéniteyS'agissant du rôle de la supplémentation en HA, cette étude doit être complétée, et plus particulièrement l'effet sur la différenciation des MSCs. Une étude de l'expression des gènes impliqués dans la différentiation ostéogénique pourra être effectuée pour mieux évaluer cet effet.

Enfin, nous avons cultivé séparément les MSCs, les ECs et les NS sur nos matrices composites. Il serait intéressant de faire une étude similaire dans des modèles de co-cultures, afin d'observer une éventuelle synergie de ces cellules sur l'activité ostéogénique, endothéliale ou neuronale. En effet, de précédents travaux réalisés dans notre équipe à l'aide de chambres de culture microfluidiques ont montré que les NS améliorent la différenciation ostéogénique des MSCs (Silva *et al*. 2017). Ils ont également un effet direct sur les fonctions des ECs et le remodelage de la MEC vasculaire (Leroux *et al*. 2020). Nous pourrions donc utiliser le modèle de chambre de co-culture en 3D développé au laboratoire BioTis qui contient un compartiment central destiné à recevoir les matrices et des compartiments latéraux séparés avec des micro-canaux pour séparer physiquement le corps cellulaire des NS de leur prolongements neuritiques. Cette séparation physique est plus proche des conditions physiologiques, et pourrait permettre de mieux mimer *in vitro* le processus d'innervation des matrices 3D colonisées par les MSCs et les ECs. Cela permettrait également d'identifier les molécules échangées lors de la communication entre ces trois types cellulaires en 3D (voir paragraphe « Conclusion et Perspectives », Schéma 1).

Dans la suite de ce travail, les matrices contenant le peptide IKVAV/YIGSR et différentes concentrations en HA ont été implantées *in vivo* chez le petit animal pour sélectionner la formulation présentant les meilleures caractéristiques en termes de formation osseuse, vascularisation et innervation

Chapitre 4 :

Évaluation *in vivo* des matrices composites à base d'ELPs en site ectopique et dans des lésions osseuses

I. Introduction.

Le rôle des systèmes vasculaire et nerveux dans le développement et le remodelage du squelette est aujourd'hui décrit dans la littérature (Niedźwiedzki and Filipowska, 2015). Dans les premières phases de la régénération du tissu osseux, le système vasculaire joue un rôle majeur grâce à l'apport en nutriments et en oxygène. De façon plus précise, dans un contexte de réparation guidée par un biomatériau, sa survie et son ostéointégration dépendent du développement d'un réseau vasculaire en son sein après son implantation. Les vaisseaux sanguins fournissent des nutriments et des facteurs de croissance aux cellules mésenchymateuses recrutées, favorisant leur différenciation vers le lignage ostéoblastique, et donc l'ostéogenèse. Les précurseurs des ostéoblastes sont en effet associés aux vaisseaux sanguins envahisseurs et sont localisés de façon périvasculaire (Maes *et al*. 2010). Si ce réseau fait défaut, la régénération du tissu osseux peut être compromise.

Les fibres nerveuses suivent les vaisseaux sanguins et se retrouvent dans le périoste, l'os trabéculaire et cortical, la moelle osseuse et la plaque épiphysaire (Brazill *et al*. 2019). Le développement des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins se produit souvent de manière concomitante, l'une suivant le trajet de l'autre (Li, Meyers, *et al*. 2019). Par ailleurs, il est désormais admis qu'un système nerveux fonctionnel est essentiel au remodelage osseux local et à la guérison des fractures (Li *et al*. 2001).

De nombreuses études expérimentales de dénervation réalisées chez le petit animal ont révélé le rôle crucial du système nerveux dans la néoformation osseuse (Song *et al*. 2012). Cao et ses collaborateurs (Cao *et al*. 2019) ont montré que l'absence de nerfs sensitifs réduit la qualité de l'os néoformé. Il est aussi connu que les patients atteints de lésions médullaires associées à une innervation périphérique insuffisante présentent une réparation osseuse altérée ainsi qu'un risque élevé de récidive des fractures (Garland & Adkins 2001).

Dans ce contexte, et suite au développement de la matrice composite à base d'ELPs fonctionnalisée par les peptides IKVAV/YIGSR, SNA15 et supplémentée en particules d'HA (Chapitre 1 et 2), puis à l'évaluation *in vitro* de sa biocompatibilité vis-à-vis des cellules mésenchymateuses, des cellules endothéliales et des neurones sensoriels (Chapitre 3), nos deux objectifs sont maintenant les suivants :

- Sélectionner la formulation des matrices composites, et plus particulièrement leur concentration en HA, qui permet d'obtenir le meilleur potentiel de vascularisation et d'innervation dans un modèle d'implantation ectopique. Pour ce faire, des matrices contenant 0 %, 1 %, 2 % et 2,5 % d'HA ont été implantées en site sous-cutané chez la souris. Les tissus néoformés ont été analysés par micro-tomographie aux rayons X (micro-CT) pour assurer le suivi de la minéralisation ectopique, par histologie et immunohistochimie pour identifier les structures vasculaires et neuronales ainsi que les marqueurs de l'inflammation.

- Évaluer la capacité de réparation osseuse de la matrice présentant les meilleures caractéristiques dans des modèles expérimentaux de lésions osseuses chez le rat. Deux modèles expérimentaux ont été évalués : le premier concerne la réparation d'une lésion du condyle fémoral de rat, le deuxième concerne la réparation d'une lésion de taille critique au niveau de la mandibule de rat. Pour ces deux modèles, la minéralisation a été suivie par micro-CT au cours du temps, et nous avons effectué des analyses histologiques pour chaque temps analysé. La formation de tissu ostéoïde a été visualisée par une coloration au Trichrome de Masson permettant de distinguer le tissu osseux néoformé. La formation de structures vasculaires, structures nerveuses et la présence de cellules osseuses, ont été évaluées par immunohistochimie avec des marqueurs vasculaires (Endomucine, Meca32, Podocalyxine), neuronaux (β III tubuline), et osseux (Osteocalcine).

II. Matériels et méthodes.

2.1. Implantations des matrices en sous-cutané.

Les matrices d'ELPs et peptides contenant 0 %, 1 %, 2 % et 2,5 % (m/v) d'HA (cf : Chapitre 2), ont été implantées en site sous-cutané chez la souris afin d'évaluer leur potentiel (i) de minéralisation ectopique, (ii) angiogénique et (iii) d'innervation aux jours J0, J3, J7, J15 et J30 post-implantation.

Figure 1 : Implantations en site sous-cutané de deux biomatériaux.

Par ailleurs, le devenir des matrices dans ce même site sous-cutané a été étudié après 3 mois et 6 mois d'implantation pour évaluer leur dégradabilité.

Brièvement, une incision de 1 cm a été réalisée à l'aide d'un scalpel et une poche a été réalisée à l'aide de ciseaux entre les couches dermique et musculaire. Deux matrices de composition différentes ont été implantées de part et d'autre de la colonne vertébrale dans des souris femelles Balb/c de 8 semaines (Figure 1). Ces souris ont été hébergées en groupe dans l'animalerie conventionnelle de

l'Université de Bordeaux. Elles ont été soumises à un rythme circadien jour-nuit et nourries à la demande. Le protocole d'expérimentation animale a été approuvé par le comité d'éthique local (protocole #4375-2016030408537165).

Temps d'implantations	0 % HA	1 % HA	2 % HA	2,5 % HA	2 % HA sans IKVAV/YIGSR	Contrôle Négatif
J0 ~4 h post-implantation	4	4	4	4	4	/
J3	4	4	4 2	4 2	/	/
J7	4 2	4 2	4 2	4 2	4	4 2
J15	4	4	4	4	4	/
J 30	4 2	4 2	4 2	4 2	4	/
3 mois	4	4	4	4	/	/
6 mois	4	4	4	4	/	/

Tableau 1 : Nombre de matrices composites ELPs implantées en site sous-cutané.

Le nombre d'échantillons en **noir** correspond à ceux utilisés pour les analyses par micro-CT et analyses histologiques et ceux en **bleu** correspond à ceux utilisés pour la technique de transparisation (voir paragraphe 2.5). Les contrôles négatifs correspondent aux animaux ayant subi l'ensemble des étapes chirurgicales exceptées l'implantation de matériaux.

Le matériau contrôle sans peptide est nommé 2 % HA sans IKVAV/YIGSR. Le contrôle négatif correspond aux animaux ayant subi les mêmes étapes de chirurgie incluant l'anesthésie, l'incision et la suture, mais aucun matériau n'a été implanté.

Les temps courts après implantation (J0, J3, J7) ont été sélectionnés pour mettre en évidence les cinétiques d'innervation, de vascularisation, ainsi qu'une possible réaction inflammatoire. Les temps J15 et J30 ont permis de mettre en évidence une minéralisation ectopique des matrices. Les temps 3 et 6 mois ont été utilisés pour étudier la biodégradation des matrices composites en fonction de leur formulation.

2.2. Implantations des matrices dans des défauts osseux.

Les implantations en défaut osseux ont été réalisées chez des rates de la lignée Wistar (Janvier Labs®, modèle RjHan:WI) âgées de 12 semaines. 30 animaux ont été utilisés respectivement dans les modèles de lésion fémorale et mandibulaire. Dans un premier temps les animaux ont été anesthésiés dans une chambre d'induction avec 4 % d'isoflurane à un débit d'air de 1,5 L/min, puis dans un second temps l'anesthésie a été maintenue à l'aide d'un masque sous 2 % d'isoflurane avec un débit d'air de 0,9

L/min. Les sites d'implantation ont été rasés puis nettoyés avec de la Bétadine®. De la buprénorphine a été injectée en sous-cutanée avant la chirurgie et les deux jours suivants.

2.2.1. Le Collapat ® comme matériau contrôle.

Le matériau Collapat® commercialisé par SYMATESE® biomatériau (France) a été utilisé comme matériau contrôle positif. C'est un substitut osseux résorbable utilisé principalement pour le comblement d'os alvéolaire par les dentistes. Il se présente sous la forme d'une éponge macroporeuse (Figure 2). Il est composé de protéines collagéniques d'origine bovine et de granules d'hydroxyapatite de synthèse. Sa composition est proche de celle des matrices composites à base d'ELPs développées dans notre travail.

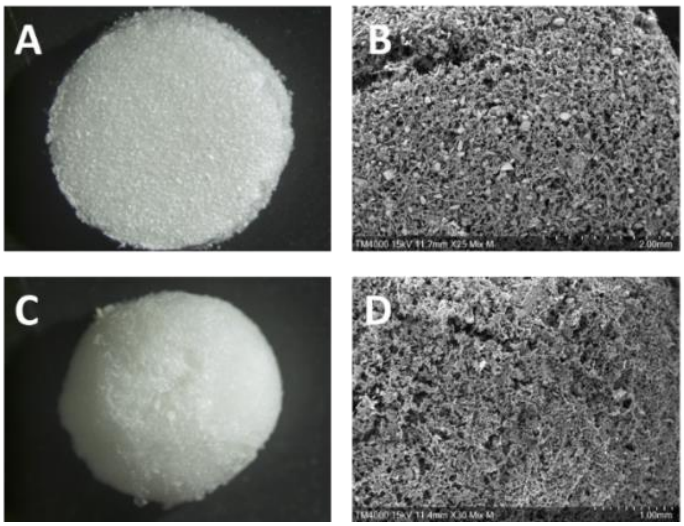


Figure 2 : Image macroscopique et par microscopie électronique à balayage (MEB) des matériaux Collapat® (A, B) et des matrices composites contenant 2 % d'HA (C,D).

2.2.2. Modèle expérimental de lésion osseuse dans le condyle fémoral de rat.

Une lésion osseuse de 3 mm de diamètre a été réalisée à l'aide d'une fraise chirurgicale dans la partie distale des condyles fémoraux de rat (Figure 3), selon le protocole #32504-2021072111152646. Trois conditions ont été étudiées : lésion laissée vide (contrôle négatif) ; lésion comblée avec du Collapat® (contrôle commercial positif) ou comblée avec notre matrice composite. Deux lésions osseuses ont été réalisées par rat, une dans chaque condyle fémoral, pour étudier des conditions différentes (Tableau 2).

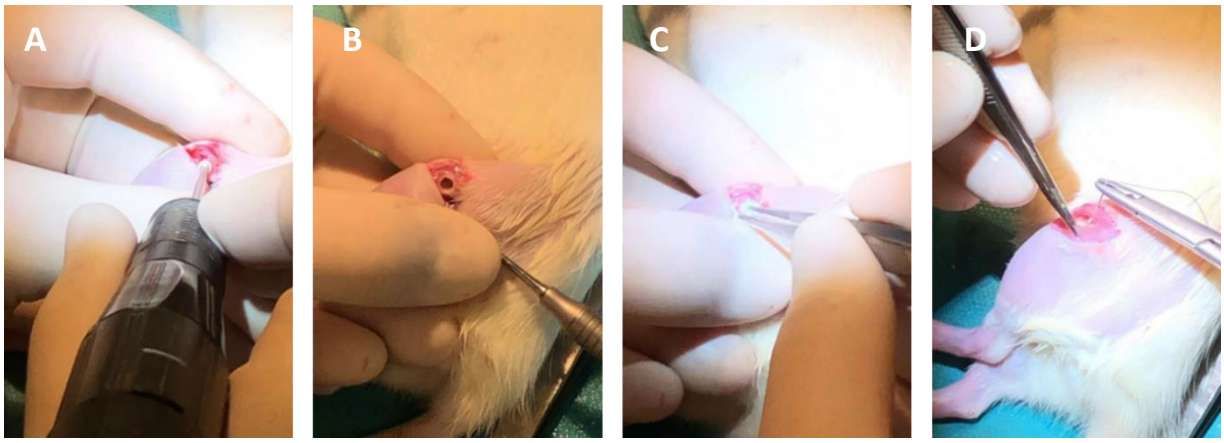


Figure 3 : Implantation des matrices composites dans une lésion osseuse réalisée au niveau de l'épiphyse du condyle fémoral.

Après une première incision permettant l'exposition du condyle fémoral, un défaut de 3 mm de diamètre est réalisé à l'aide d'une fraise (**A**), l'os découpé est enlevé (**B**), le défaut est alors comblé par le biomatériau d'intérêt (**C**). Le muscle puis la peau sont recousus à l'aide de fils résorbables (Vicryl Ethicon, 4/0) (**D**) et des agrafes sont posées. De l'Aluspray®(Vetoquinol®) est posé pour favoriser la cicatrisation de la plaie.

Temps après implantation	Matrice composite ELPs	Défaut non comblé	Collapat®
J7	4	4	4
J15	4	4	4
	2	2	2
J30	4	4	4
	2	2	2
J60	4	4	4

Tableau 2 : Nombre de matériaux implantés en site osseux aux différents temps.

Le contrôle négatif correspond au site non comblé, le matériau contrôle est le Collapat® et le matériau testé est la matrice composite d'ELPs. Le nombre d'échantillons en **noir** correspond à ceux utilisés pour les analyses histologiques et immunohistochimiques et ceux en **bleu** correspond à ceux utilisés dans la technique de transparisation.

La réparation osseuse a été suivie *in vivo* par micro-CT aux temps J7, J15, J30 et J60. Les animaux ont été sacrifiés aux mêmes temps (4 à 5 animaux par temps), et les fémurs ont été prélevés et fixés en PFA 4 % pour les études histologiques et immunohistochimiques.

2.2.3. Modèle expérimental de lésion osseuse de taille critique dans la mandibule de rat.

Une lésion osseuse circulaire de 3,3 mm de diamètre a été réalisée dans la partie latérale de la mandibule (ramus), à l'aide d'un trépan selon la saisine #32463-202201261842498. Ces lésions osseuses ont été soit laissées vides, soit comblées avec du Collapat® ou avec notre matrice d'intérêt. La minéralisation osseuse a été suivie *in vivo* par micro-CT après 7, 15, 30 et 60 jours d'implantation.

Les animaux ont été euthanasiés aux différents temps, et les mandibules ont été prélevées pour réaliser les analyses histologiques et immunohistochimiques.

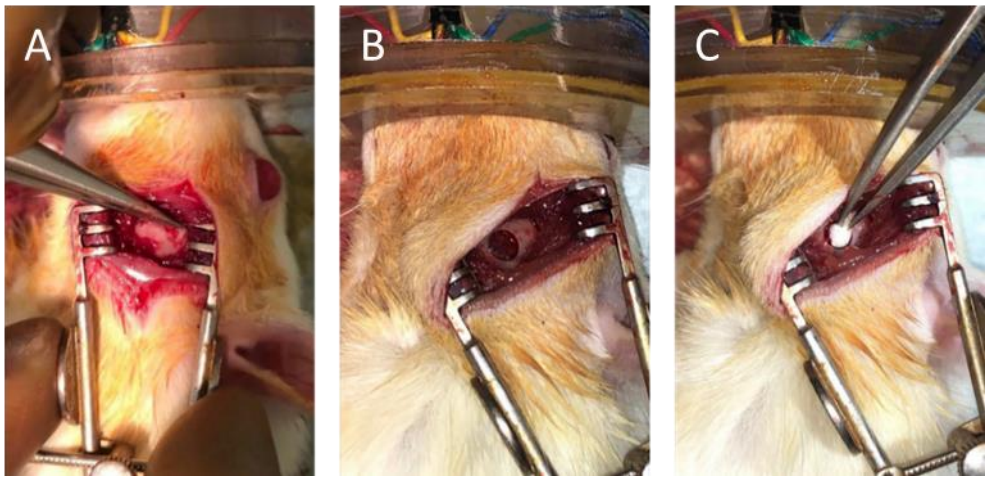


Figure 4 : Réalisation d'un défaut osseux dans l'os de la mandibule et implantation du biomatériau.

Après une première incision permettant l'exposition de la mandibule (**A**), un défaut de 3,3 mm de diamètre est réalisé à l'aide d'un trépan, l'os découpé est enlevé (**B**), le défaut alors comblé par le biomatériau d'intérêt (**C**). Le muscle puis la peau sont recousus à l'aide de fils résorbables (Vicryl Ethicon, 4/0) et des agrafes sont posées. La cicatrice est aspergée avec de l'Aluspray®(Vetoquinol®) pour faciliter la vascularisation.

2.3. Suivi de la minéralisation par microtomographie aux rayons X (micro-CT).

La réparation des lésions osseuses a été suivie par microtomographie aux rayons X à haute résolution. Cette méthode d'analyse non invasive nous a permis de suivre la reconstruction osseuse de façon longitudinale chez le même animal par la reconstruction d'images en trois dimensions.

L'appareil de microtomographie à rayons X utilisé dans cette étude est un Quantum FX Caliper (Life Sciences®, Perkin Elmer, Waltham, MA). La source de rayons X a été réglée à 80 kV et 200 µA. Les données brutes 3D ont été obtenues en faisant tourner autour des animaux à la fois la source de rayons X et le détecteur à 360 ° avec un pas de rotation de 0,6 °. Ces derniers ont été maintenus sous anesthésie générale avec 2 % d'isofluorane pendant l'acquisition des images. Les projections d'images ont été automatiquement reconstruites (logiciel RigakuSW®, Caliper) en une pile Dicom. Pour la reconstruction tridimensionnelle, le logiciel eXplore MicroView® (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI) a été utilisé. La région d'intérêt (ROI) a été déterminée comme étant le volume du défaut osseux initial, permettant la quantification du volume osseux néoformé par rapport au volume total des échantillons (volume osseux/volume total = BV/TV).

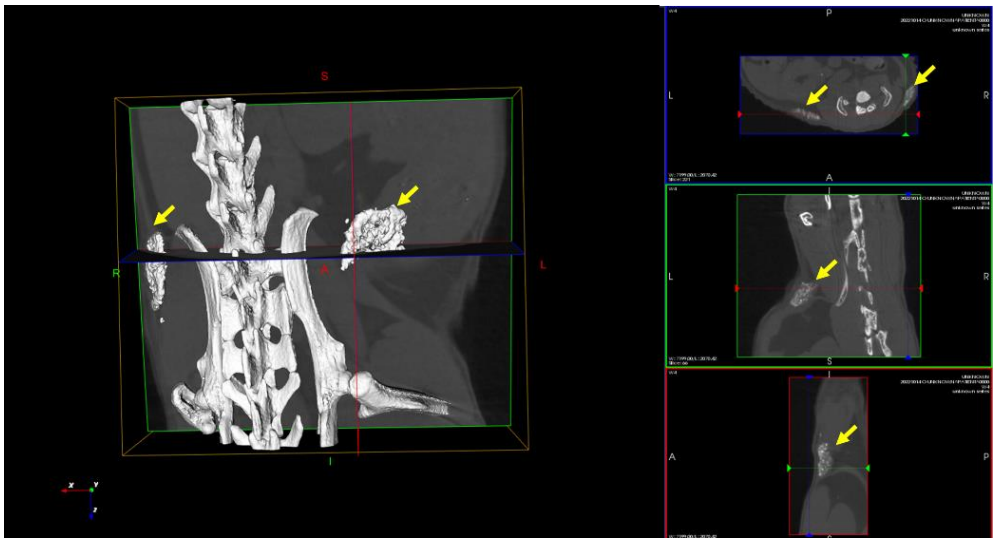


Figure 5 : Analyse des matrices composites implantées en sous-cutané à l'aide du logiciel Micro View®.

L'emplacement des matrices composites est indiqué à l'aide des flèches jaunes. Les matrices ELPs sont visibles dans le plan axial (bleu), coronal (vert) et sagittal (rouge) après 15 jours d'implantation.

2.4. Analyses histologiques des matrices implantées.

Suite à l'imagerie micro-CT, les souris et les rats ont été sacrifiés dans une chambre à CO_2. Les matrices et le tissu environnant ont été récupérés et fixés avec du PFA à 4 % (Antigenfix®, DIAPATH) pendant 24 h à température ambiante. Les matrices implantées en sites osseux ont subi une étape supplémentaire de décalcification avec du Microdec® (DIAPATH, France) pendant au moins 1 mois avec un changement de solution toutes les semaines. Cette solution permet de chélater les ions Ca^{2+}, rendant alors le tissu osseux moins dur, ce qui facilite les coupes histologiques au microtome.

Tous les échantillons ont été déshydratés et inclus dans de la paraffine. Des sections de 7 µm ont été obtenues à l'aide d'un microtome (Erpedia® modèle HM 340E).

Avant coloration et immunomarquage toutes les lames ont été préalablement déparaffinées à l'aide de 3 bains d'OTTIX® (DIAPATH). Les échantillons ont ensuite été réhydratés par des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante (100 %, 95 % et 70 %) pendant 5 min.

2.4.1. Colorations histologiques au Trichrome de Masson.

2.4.1.1. Coloration au Trichrome de Masson.

Les coupes histologiques issues des deux modèles d'implantation (ectopique et orthotopique) ont été colorées au Trichrome de Masson modifié (le bleu d'aniline est remplacé par le vert lumière qui présente l'avantage d'être moins toxique pour l'expérimentateur). Les lames ont été colorées par trois solutions successives : une solution d'Hémalun (VWR # 1.09249.2500) , un mélange Fushine – Ponceau 1% (m/v)(VWR/RAL # 313200-0025 et RAL#316150-0025), et le Vert Lumière 1 % (m/v) (Merck #

1.15941.0025). La procédure colore en rouge le tissu ostéoïde, en bleu/vert le collagène de type I et le tissu osseux, en rose les cytoplasmes, et en noir les noyaux de cellules.

Après coloration, les coupes ont été déshydratées par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (70 %, 95 %, 100 %) pendant 2 min, suivis de 3 bains d'OTTIX® pendant 2 min. Enfin, un montage entre lame et lamelle a été réalisé à l'aide d'un milieu de montage (Diamount®, MM France). Des acquisitions ont ensuite été réalisées avec un microscope à scanner de lames, couplé à une caméra TDI 3-CCD, et en utilisant le logiciel Nanozoomer Digital Pathology® (Hamamatsu Photonics, Japon).

2.4.1.2. Quantification du tissu ostéoïde et collagénique néoformés.

Les pourcentages de tissu collagénique et de tissu ostéoïde ont été déterminés à partir des coupes histologiques colorées au Trichrome Masson (TM) en utilisant une macro spécialement conçue sur ImageJ (Figure 6). Une région d'intérêt (ROI) a été sélectionnée pour déterminer la zone correspondant à la lésion. Les zones colorées en rouge foncé correspondant à du tissu ostéoïde et celles en vert à du tissu collagénique ont été détectées de façon semi-automatique. Les résultats de la quantification du TM ont été exprimés en pourcentage de surface d'os néoformé par rapport à la surface totale. Ils sont présentés sous forme de moyenne ± écart type. Pour les matrices implantées en site sous-cutané, le nombre d'échantillons était compris entre 14 et 24 suivant le temps post-implantation ; pour les matrices implantées dans le défaut condylaire, le nombre d'échantillons (coupes) variait entre 18 et 28 et entre 9 et 27 pour les matrices implantées dans un défaut mandibulaire.

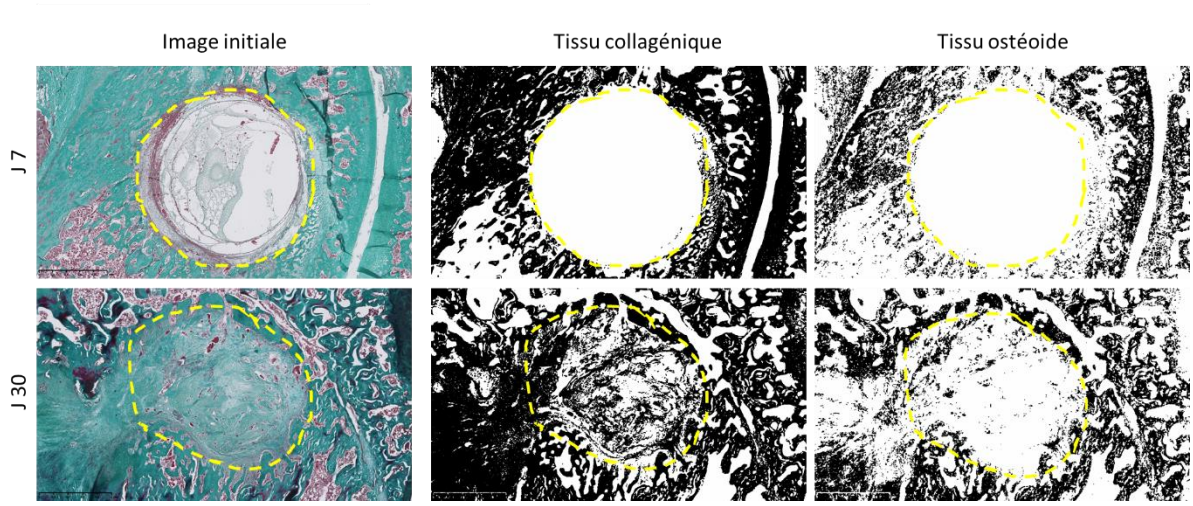


Figure 6 : Représentation de la méthode de quantification des tissus collagéniques et ostéoïdes à l'aide du logiciel ImageJ®.

Deux coupes histologiques de lésions condylaires non comblées et colorées au TM, 7 et 30 jours après la chirurgie, sont représentées en image initiale. La ROI utilisée pour délimiter le défaut et permettre ainsi la quantification est représentée en jaune. Les couleurs représentant les tissus collagéniques et ostéoïdes sont indiquées.

2.4.2. Analyse immunohistologique.

2.4.2.1. Immunofluorescence des structures nerveuses et vasculaires.

Pour compléter les analyses histologiques des immunomarquages ont été réalisés sur les échantillons coupés. Les anticorps anti - β III tubuline (Abcam®, ab18207) dilués au 1 :1000ème et les anticorps anti - Endomucine (Santa Cruz®, sc65495) dilués au 1 :100ème ont été utilisés afin de mettre en évidence respectivement les fibres neuronales et les vaisseaux sanguins. Les anticorps anti - Meca 32 (BP Pharmingen®, 550563) dilués au 1 :10ème et anti - Podocalyxine (R&D Systems®, MAB1556) dilués au 1 :1000ème ont été utilisés en supplément de l'endomucine pour les expériences dites de « transparisation » en 3D.

Le démasquage des sites antigéniques a été effectué par incubation dans un tampon citrate (Target Retrieval Solution, Low pH -Dako Omnis®) à 95 °C pendant 20 min. Les coupes de tissus ont ensuite été incubées dans un tampon de perméabilisation (0,5 % Triton X-100 dans le PBS 1X pH 7,4) pendant 30 min à température ambiante (RT), puis dans un tampon de saturation (0,1 % Triton X-100 et 10 % de sérum d'âne dans du PBS 1X pH 7,4) pendant 1,5 h à température ambiante. Ensuite, les coupes ont été incubées avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de saturation pendant une nuit à 4 °C, suivi d'une incubation avec les anticorps secondaires fluorescents Alexa Fluor® A488 (Invitrogen® A32790TR) et A568 (Invitrogen® A10042) dilués dans le PBS 1X pH 7,4 puis incubés pendant 1,5 h à température ambiante. Toutes les coupes ont été incubées avec du DAPI (Thermo Scientific™, Allemagne) (1 : 1000) pendant 20 min à température ambiante pour colorer les noyaux cellulaires.

Les échantillons ont été montés à l'aide de l'AquaPolymount (Polysciences®, VWR). L'imagerie des échantillons a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (SP8, Leica Microsystems) à l'aide d'un objectif 20X.

La surface des vaisseaux et des nerfs a été quantifié à l'aide du logiciel Imaris ®.

2.4.2.2. Immunofluorescence des cellules inflammatoires et osseuses.

Le même protocole que précédemment décrit a été utilisé pour marquer les cellules inflammatoires en utilisation des anticorps primaires dirigés contre le Cd11b et le CD45. Le Cd11b (Invitrogen® PA5-79532) est un marqueur de toute la lignée myéloïde, qui marque les monocytes, macrophages, et neutrophiles, il a été utilisé dilué au 1:1000ème. Le CD45 (Invitrogen® 13-0451-82) marque les leucocytes et a aussi été utilisé dilué au 1:1000ème.

L'anticorps anti-ostéocalcine (R&D Systems®, MAB1419) dilué au 1 :200ème a permis de mettre en évidence la présence des cellules osseuses dans les défauts condylaires.

2.5. Transparisation des tissus et mise en évidence des réseaux neuronaux et vasculaires.

Afin d'observer l'intégralité des réseaux neuronaux et vasculaires dans la matrice et dans les tissus environnants, nous avons utilisé la technique dite de transparisation couplée à un immunomarquage classique.

2.5.1. Immunomarquage en « whole-mount ».

L'immunomarquage en *whole-mount* a été réalisée comme décrit précédemment (Belle *et al.*, 2014). Les souris et les rats ont été préalablement perfusés par voie intracardiaque avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4 %. Brièvement, les tissus ont été disséqués et immergés dans la même solution de fixation (PFA 4 %) pendant 24 h à 4 °C. Pour les tissus osseux, une étape supplémentaire de décalcification a été faite grâce à une incubation en Microdec® (EDTA) pendant 2 semaines à température ambiante sous agitation. Les échantillons ont ensuite été déshydratés avec des solutions croissantes de méthanol (20 %, 40 %, 60 %, 80 % et 100 %) pendant une heure à température ambiante. Les échantillons ont été blanchis grâce à une solution contenant 6 % de H_2O_2 dans du méthanol pendant une nuit à 4 ˚C. Les échantillons ont été réhydratés dans des solutions décroissantes de méthanol de 100 à 20 % pendant une heure, puis lavés deux fois avec une solution de blocage PBSGSTT (PBS Gélatine Saponine Triton Thimerosal) contenant 0,2 % (m/v) de gélatine, 0,1 % (m/v) de saponine, 0,5 % (v/v) de Triton X-100 et 0,01 % (v/v) de Thimerosal dans du PBS 1X pH 7,4 (Gibco®). Ensuite, les tissus ont été incubés pendant deux jours dans la solution de blocage à 37 °C. Les anticorps primaires ont été dilués dans la solution de PBSGSTT et incubés pendant une à deux semaines à 37 °C, suivis de lavages dans le PBSGSTT à température ambiante. Les anticorps secondaires ont été incubés dans le même tampon pendant trois à six jours à 37 °C, puis lavés dans du PBSGSTT à température ambiante.

2.5.2. « Transparisation » des tissus.

La « transparisation » des tissus a été effectuée selon le protocole iDISCO+ (Renier *et al.*, 2016). Brièvement, les tissus ont été déshydratés dans des solutions croissantes de méthanol (20 %, 40 %, 60 %, 80 % et 100 %) pendant une heure, puis délipidés par incubation dans un mélange dichlorométhane / méthanol (1:3) pendant 3 h à température ambiante. Enfin, les tissus ont été « transparisés » par immersion dans de l'éther dibenzylique (Sigma® Cat#108014) pendant une nuit à température ambiante.

2.5.3. Acquisition et traitement des images.

L'imagerie des échantillons en 3D a été réalisée à l'aide d'un ultramicroscope à fluorescence à feuille de lumière (LaVision BioTec Ultramicroscope II) et du logiciel ImspectorPro®. Les images volumiques 3D ont été générées à l'aide du logiciel Imaris®.

Le traitement des images a été effectué à l'aide du logiciel Imaris® pour le comptage cellulaire dans les volumes 3D. Tous les volumes ont été déterminés sur la base de l'autofluorescence du tissu, créé manuellement avec l'outil "Surface" de Imaris®. La coloration positive a été comptée automatiquement dans les volumes précédemment définis en utilisant l'outil " Surface ".

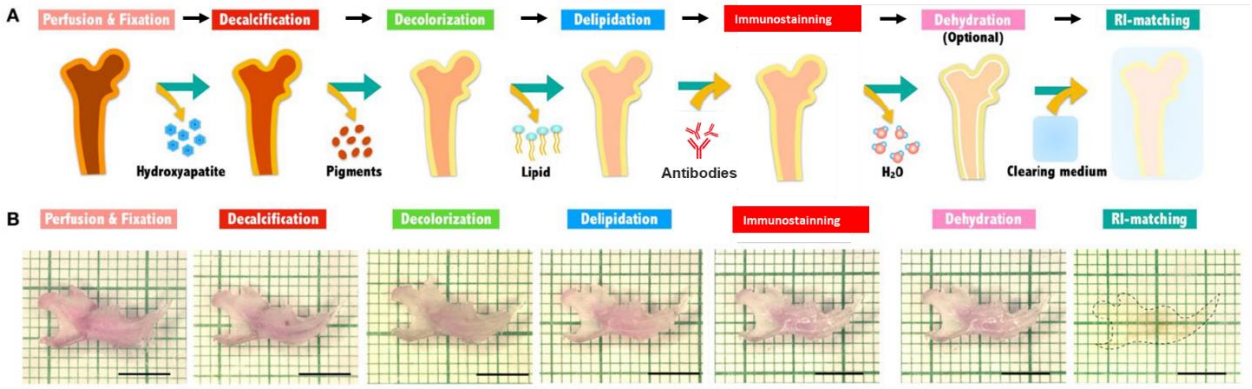


Figure 7 : Résumé des principales étapes nécessaires à la technique de « transparisation » ou « *Tissue Clearing* » des tissus osseux, adapté de Jing *et al.*, 2019.

Les tissus durs (os et dents) sont distincts des tissus mous de par leur minéralisation élevée, leur contenu enrichi en collagène, une faible teneur en lipides et la présence d'une moelle osseuse contenant des cellules sanguines fortement autofluorescentes. Le protocole de « transparisation » ou « *Tissue Clearing* » a été adapté avec une étape de décalcification et une dépigmentation préalable, puis les étapes habituelles de délipidation, immunomarquage, déshydratation et « transparisation » ont été effectuées.

2.6. Analyses statistiques.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism®. L'évaluation de la signification statistique des différences a été réalisée à l'aide d'un test d'analyse de la variance (ANOVA) non paramétrique. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne et écart type.

III. Résultats des implantations en site ectopique des matrices ELPs supplémentées avec différentes concentrations d'HA.

Des matrices d'ELPs et peptides contenant différentes concentrations en particules d'HA ont été implantées en site sous-cutané pour sélectionner celle présentant les meilleures capacités en termes de minéralisation, de vascularisation et d'innervation. Les quatre matrices différaient seulement par leur contenu en HA (0 %, 1 %, 2 % et 2,5 % de particules).

3.1. Potentiel de minéralisation des matrices composites ELPs.

La minéralisation des matrices implantées en site sous-cutané a été suivie par micro-CT dès l'implantation (J0) de la matrice, puis après 15 et 30 jours (J15 et J30) (Figure 8). Au jour 0 aucune minéralisation n'est observée dans les implants 0 %, 1 % et 2 % HA alors qu'une très faible minéralisation est observée pour la matrice 2,5 % HA (Figure 8). Ces résultats indiquent que les particules d'HA aux concentrations étudiées ne sont que peu visibles par la technique de micro-CT.

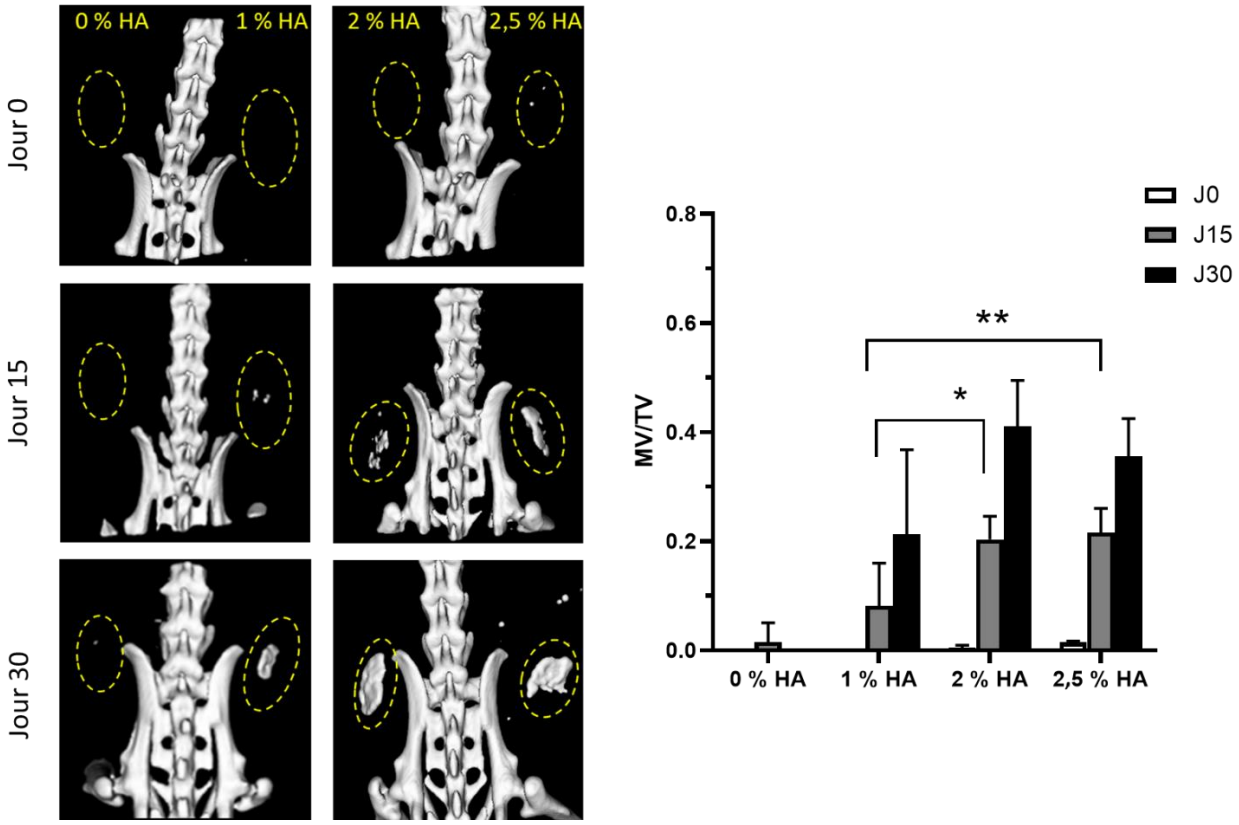


Figure 8 : Suivi longitudinal de la minéralisation des matrices par micro-CT.

Images micro-CT représentatives de l'implantation sous-cutanée des matrices sans HA ou contenant 1 %, 2 % et 2,5 % (m/v) d'HA après 0, 15 et 30 jours d'implantation. Le volume minéral/volume total (MV/TV) a été mesuré à partir d'images micro-CT tridimensionnelles reconstruites à l'aide du logiciel Microview®. Le test statistique ANOVA suivi du test post hoc de Bonferroni avec * $p<0.05$ et ** $p<0.01$ a été réalisé.

Après 15 et 30 jours d'implantation, du tissu minéralisé ectopique s'est formé dans les matrices contenant les particules d'HA. Le volume de tissu minéralisé formé dans ces matrices composites augmente au cours du temps (Figure 8). Toutefois, aucune minéralisation n'a été détectée après implantation des matrices dépourvues d'HA, démontrant l'importance de ces particules dans le processus de minéralisation. Après 1 mois d'implantation (J30) les matrices contenant 1 % d'HA ont induit une augmentation du volume minéral de 21 ± 10 %, de 42 ± 7 % pour celles contenant 2 % d'HA, et de 37 ± 5 % pour les matrices contenant 2,5 % de particules. Nous n'avons pas mesuré de différence significative dans la quantité de tissu minéralisé formé entre les matrices contenant 2 % et 2,5 % d'HA après 30 jours d'implantation. Le suivi de la minéralisation de la matrice 2 % HA est présenté Figure S1 (paragraphe « Annexes »).

3.2. Étude des propriétés ostéoinductrices des matrices composites.

Après 4 semaines d'implantation, les matrices ont été excisées, incluses dans de la paraffine et analysées histologiquement par coloration au trichrome de Masson afin d'évaluer l'architecture tissulaire, la colonisation cellulaire, l'inflammation et la formation de tissu ostéoïde.

Les coupes histologiques des matériaux associées aux tissus épidermiques, adipeux et musculaires environnants montrent qu'après 1 mois d'implantation il se produit très peu de fibrose autour des matrices d'ELPs, et ce quelle que soit la formulation (Figure 9). Cela indique que les matrices induisent peu d'inflammation et qu'elles ne sont pas rejetées. Ces résultats sont en accord avec la biocompatibilité démontrée *in vitro* (Chapitre 3). La structure en feuillet précédemment observée pour les matrices en cryo-MEB (Chapitre 2) est retrouvée sur ces coupes, ainsi que la présence de pores.

La présence de noyaux cellulaires au sein des matrices implantées a également été observée, indiquant que des cellules ont été capables de pénétrer à l'intérieur de ces matrices.

Les tissus et les matrices n'ayant pas été décalcifiés, certaines zones de forte minéralisation ont été endommagées lors des coupes au microtome. Toutefois, on remarque la présence de minéralisation sous forme de cristaux de couleur violet foncé. On peut également observer la présence de tissu ostéoïde en périphérie et au sein des matrices.

La quantité de tissu ostéoïde nouvellement formé (Figure 9B) augmente de façon significative en fonction de la quantité d'HA dans la matrice de 0 à 2 %. En revanche, les valeurs mesurées dans les matrices contenant 2,5 % de fraction minérale ne sont pas significativement différentes de celles qui en contiennent 2 %.

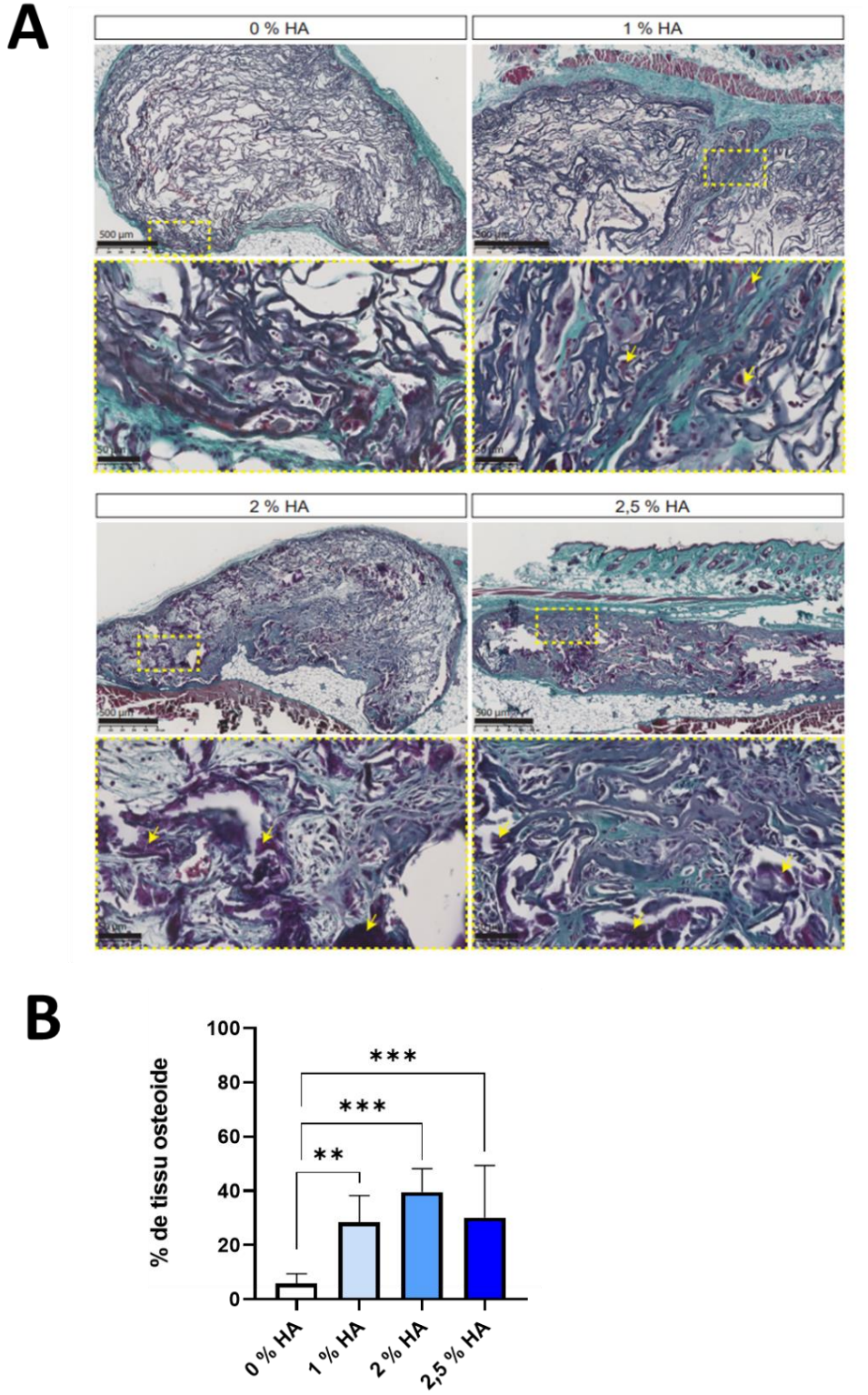


Figure 9 : Analyse histologique des matrices implantées en site ectopique et colorées au Trichrome de Masson.

Les matrices comprenant 0 %, 1 %, 2 % et 2,5% d'HA ont été implantées en sous-cutané et colorées au Trichrome de Masson. Les flèches jaunes mettent en évidence la présence de minéral. Barre d'échelle du haut = 500 µm, Barre d'échelle du bas = 50 µm. Analyse quantitative des tissus ostéoïde formés ($15 < n < 23$ par échantillon) avec un test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis avec $p^{**} < 0.01$ et $p^{***} < 0.001$.

La quantification du tissu ostéoïde formé ayant été réalisée à l'aide d'un programme automatisé, une surestimation de ces quantités a pu être faite. Il aurait été préférable de faire une quantification manuelle mais cela n'était pas raisonnablement envisageable pendant le temps imparti.

En conclusion, la matrice contenant 2 % de particules d'HA semble être la meilleure formulation pour stimuler un processus de minéralisation et d'ostéoinduction.

3.2. Potentiel angiogénique et d'innervation des matrices ELP.

La formation de structures vasculaires et nerveuses a été observée par immunomarquage d'un marqueur vasculaire (Endomucine) et d'un marqueur neuronal (β III tubuline). Durant cette étude, des coupes histologiques des matrices ont été réalisées à 0, 3, 7, 15 jours et 1 mois post-implantation pour déterminer la cinétique de formation de ces structures. Pour faciliter la lecture, seules les coupes correspondant au matrices composites contenant 2 % HA sont montrées dans la Figure 10A. Des résultats similaires ont été obtenus pour les matrices contenant les autres concentrations en HA.

En ce qui concerne la formation de structures vasculaires au jour 0, environ 3 à 4 heures après implantation, aucun vaisseau sanguin n'a été observé dans les matrices (Figure 10A). Trois jours après l'implantation, des vaisseaux sanguins apparaissent principalement à la périphérie des matrices, puis nous observons leur infiltration au 7ème jour. Après 15 jours d'implantation, les vaisseaux sont présents à la fois à la périphérie mais aussi à l'intérieur des matrices. Au 30ème jour, le réseau vasculaire au sein des matrices s'est densifié.

Ces observations sont confirmées par la quantification des vaisseaux sanguins à l'intérieur des matrices étudiées (Figure 10B). Après 1 mois d'implantation, les structures vasculaires augmentent d'environ 10 % dans toutes les matrices, quelle que soit la concentration en HA. Seule une différence significative est observée entre les matrices sans HA (0 %) et celles contenant 1 % d'HA.

La capacité de la matrice à stimuler l'innervation a également été démontrée par la présence de nerfs à la périphérie du matériau, en particulier aux premiers stades après l'implantation (Figure 10A). Lors de la régénération osseuse, les structures nerveuses sont les premières à apparaitre, et ce dès les stades précoces suivant la lésion osseuse. Ceci explique la présence de plusieurs fibres nerveuses visibles à la périphérie de la matrice composite dès le 3ème jour d'implantation. Après 1 mois, les structures nerveuses sont toujours détectées en périphérie de la matrice, mais leur diamètre semble avoir augmenté.

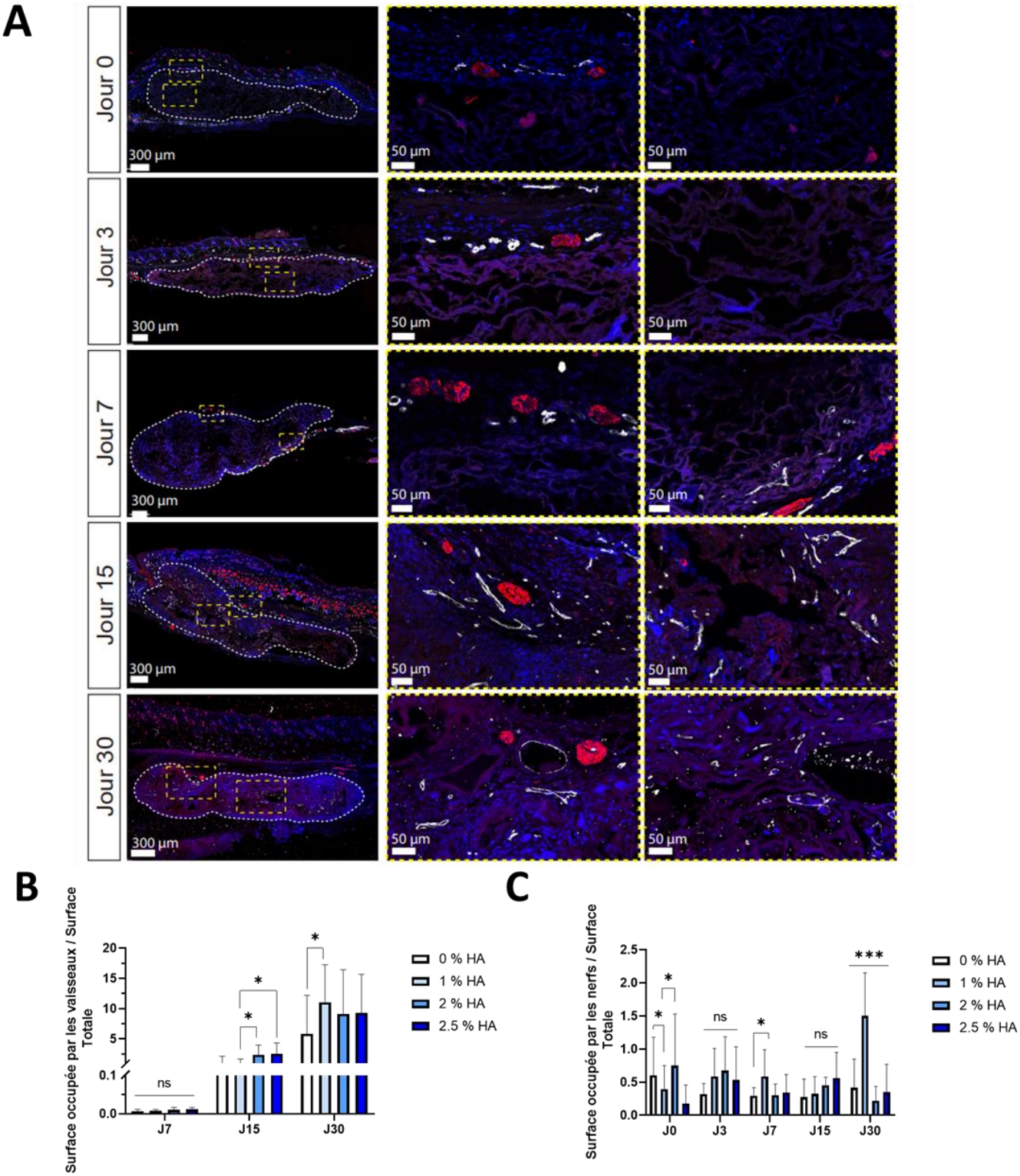


Figure 10 : Immunomarquage des réseaux vasculaires et des structures nerveuses dans les matrices composites contenant 2 % d'HA après 0, 3, 7, 15 et 30 jours d'implantation en site ectopique.

(**A**) Coupes représentant les matrices implantées en site ectopique. Les vaisseaux sanguins ont été immunomarqués par des anticorps dirigés contre l'endomucine (blanc), et les fibres nerveuses par des anticorps anti - β III tubuline (rouge). Le DAPI permet de voir en bleu les noyaux des cellules. L'emplacement des matrices a été entouré en pointillé blanc (colonne de gauche). Les images centrales sont un grossissement des zones périphériques. Les images de droite correspondent au centre des matrices. (**B**) Quantification de la surface occupée par les vaisseaux sanguins rapportée à la surface de la matrice x 1000. (**C**) Quantification de la surface occupée par les structures nerveuses rapportée à la surface de la matrice x 1000. Analyse quantitative avec un test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis.

Les résultats quantitatifs obtenus par mesure de la surface occupée par les structures nerveuses localisées à la périphérie des matrices par rapport à la surface totale des matrices ont confirmé les observations précédentes (Figure 10C). En termes de formulation, il semble que les matrices composites contenant 1 % d'HA stimulent de façon significative la formation de structures nerveuses après un mois d'implantation. C'est particulièrement visible lorsque l'on compare ces résultats avec ceux obtenus avec les matrices sans HA, ou supplémentées avec 2,5 % d'HA.

Cependant, il convient de noter que ces résultats doivent être considérés avec prudence car la densité de nerfs ou de vaisseaux mesurée peut varier en fonction de l'emplacement et/ou de l'angle des coupes des tissus. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé une technique permettant de visualiser l'intégralité du tissu en 3 dimensions après marquage par immunofluorescence des réseaux neuronaux, et ce sans avoir à couper l'échantillon (Figure 11).

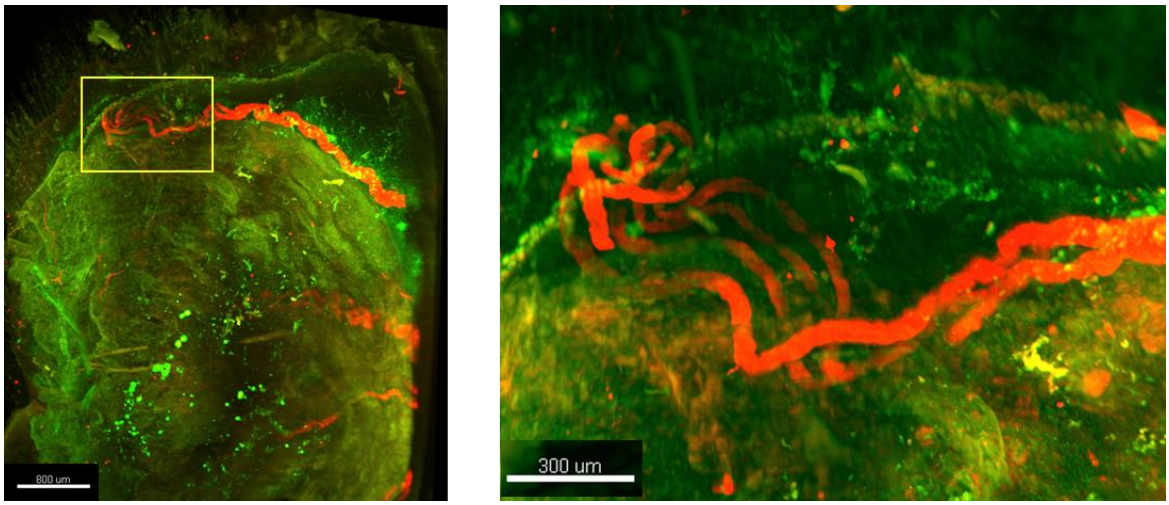


Figure 11 : Réseau des structures nerveuses en 3D dans les matrices composites contenant 2 % de particules d'HA après 1 mois d'implantation en site sous-cutané.

Les images d'immunofluorescence montrent le réseau neuronal (β III tubuline) en rouge en 3D autour de la matrice qui présente une auto fluorescente (en vert). Barre d'échelle de l'image de gauche = 800 µm.

La Figure 11 montre en 3 dimensions l'autofluorescence de la matrice (en vert) et la présence de réseaux de structures nerveuses exprimant la β III tubuline en rouge. On peut en particulier voir une forte présence des structures nerveuses à proximité de la matrice, bien qu'elles ne soient pas réparties de manière homogène. Les réseaux vasculaires semblent au contraire répartis de manière homogène (Figure S2, paragraphe « Annexes »).

3.3. Étude de la réaction inflammatoire après implantation sous-cutanée des matrices composites.

La réaction inflammatoire, lorsqu'elle est modérée, est un processus essentiel à la régénération tissulaire et à la vascularisation des tissus (Soliman & Barreda 2022). En revanche, une réponse trop forte du système immunitaire peut entrainer le rejet de l'implant.

Dans le cas des matrices composites, l'analyse histologique par coloration au TM n'a pas mis en évidence de capsules fibrotiques inflammatoires autour des implants, quelle que soit leur composition.

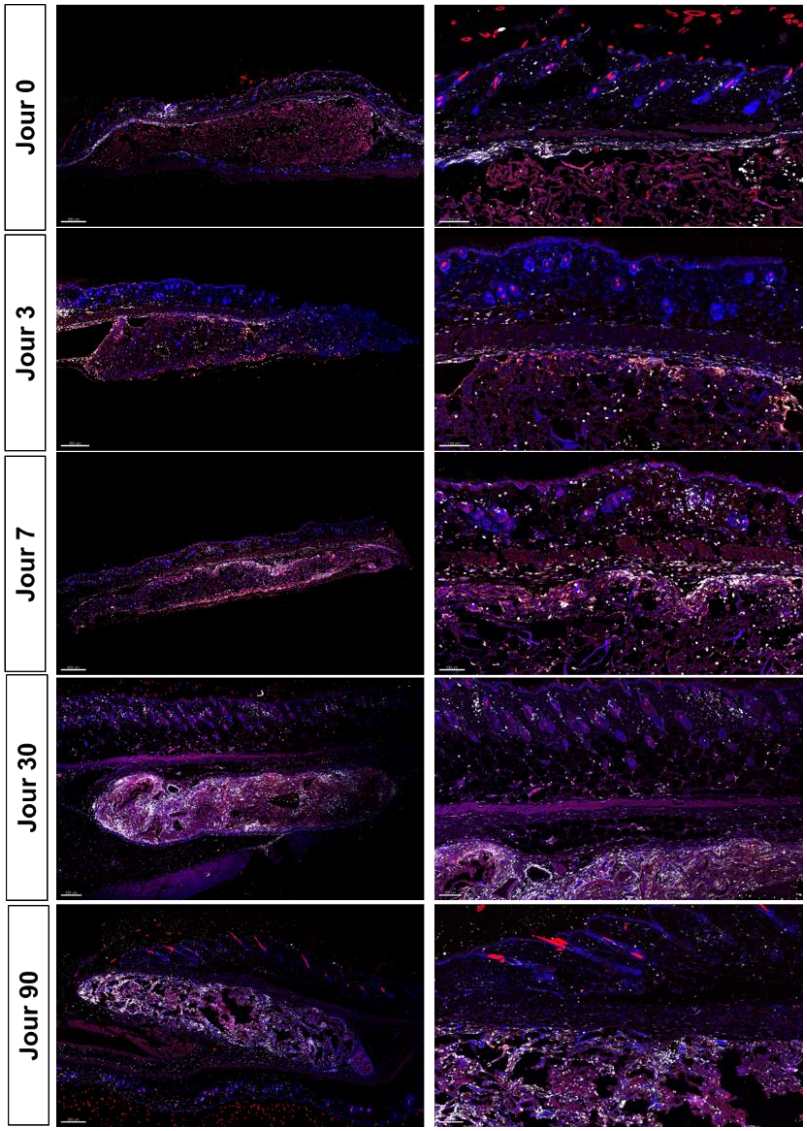


Figure 12 : Immunomarquage du CD11b et CD45 sur des coupes histologiques des matrices après 0, 7, 30 et 90 jours d'implantation.

Coupes représentant les matrices 2% HA implantées en site ectopique entière (gauche) ainsi qu'un grossissement à la zone périphérique (droite). Un immunomarquage a été réalisé pour mettre en évidence le CD11b (blanc) un marqueur des monocytes, des macrophages, et des neutrophiles, et le CD45 (rouge) un marqueur des leucocytes. Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle gauche = 300 µm, barre d'échelle droite = 100 µm.

Pour confirmer ces données, nous avons effectué un immunomarquage des populations des cellules immunitaires. Nous avons utilisé comme marqueurs de l'inflammation le CD11b qui est exprimé par

toute la lignée cellulaire myéloïde (monocytes, macrophages, neutrophiles) et le CD45 qui est un marqueur plus spécifique des lymphocytes. Nous avons constaté qu'il y a un recrutement de cellules immunitaires à la périphérie de la matrice quelques heures après l'implantation. Ces cellules sont détectées jusqu'au 7ème jour post-implantation. Par la suite, après 3 mois et 6 mois les cellules immunitaires ne sont plus présentes qu'à l'intérieur de la matrice. Il pourrait s'agir de macrophages qui joueraient un rôle dans la dégradation de la matrice.

3.4. Étude *in vivo* du devenir de la matrice composite.

Pour connaître la durée de vie des matrices, des implantations en site sous-cutané ont été réalisées et nous avons suivi leur devenir jusqu'à 6 mois d'implantation.

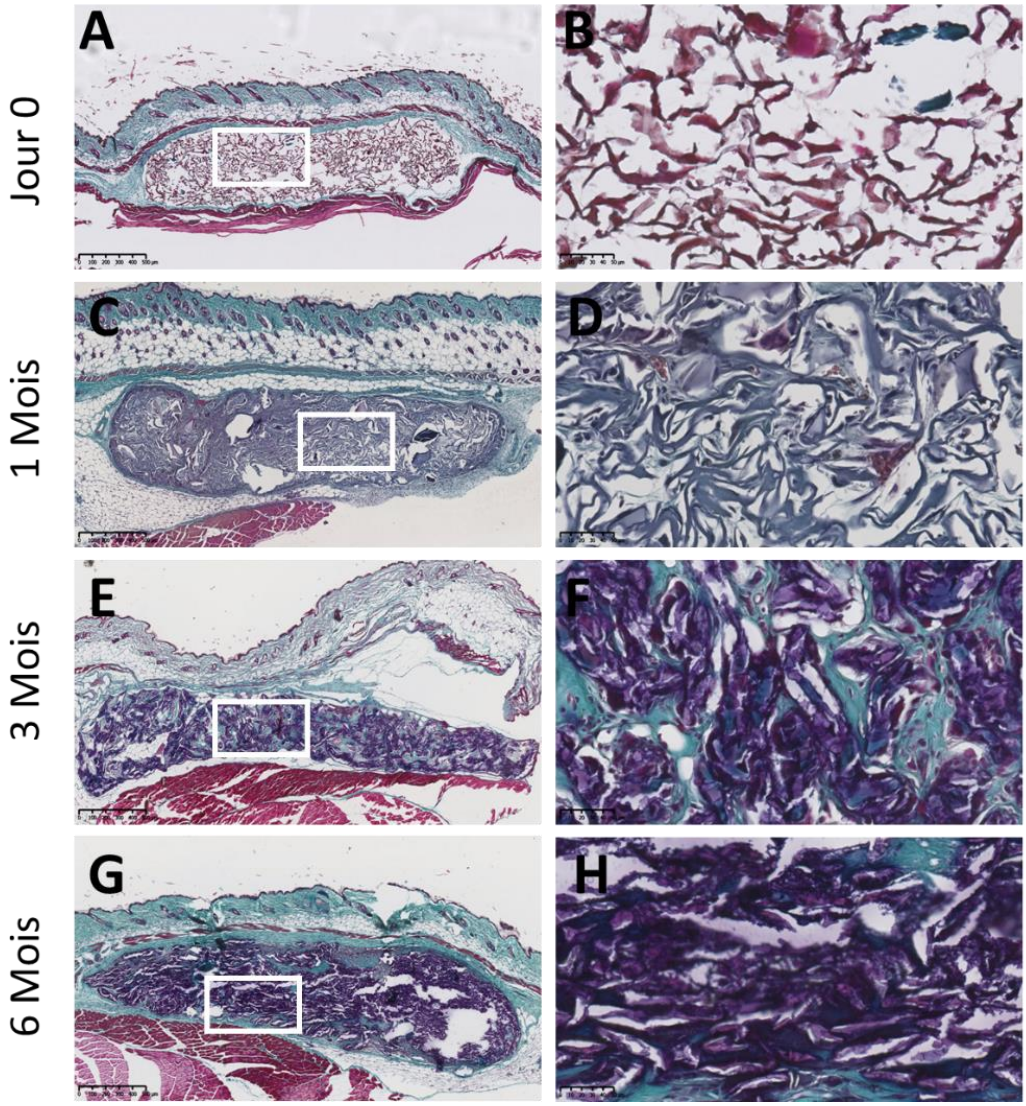


Figure 13 : Suivi des matrices contenant 2 % d'HA, implantées en site sous-cutané

Les matrices composites à 2 % d'HA ont été implantées en site sous-cutané. Après 4h, 1 mois, 3 mois et 6 mois d'implantation les matrices et les tissus environnants ont été inclus en paraffine, des coupes de 7 µm ont été réalisées et ont été colorées au Trichrome de Masson. Barre d'échelle pour A, C, E et G = 500 µm et pur B, D, F et H = 50 µm.

Juste après l'implantation (J0), la matrice composite contenant 2 % de particules d'HA est bien visible (couleur rougeâtre), et on y distingue des cristaux d'HA colorés en bleu (Figure 13). Après 1 mois d'implantation, les espaces libres laissés par les pores se comblent suite à la colonisation cellulaire. Nous pouvons identifier plusieurs noyaux à l'intérieur de la matrice. Après 3 mois d'implantation, la structure de la matrice n'est plus visible ce qui est probablement dû à sa dégradation par le système immunitaire. On peut noter la présence d'une forte composante cellulaire et d'une matrice extracellulaire qui comble les espaces précédemment occupés par le matériau composite. Des résultats similaires sont observés après 6 mois, avec toutefois une augmentation de la minéralisation de toute la zone préalablement occupée par la matrice composite.

Pour conclure sur ces études réalisées en site ectopique, les matrices développées à partir d'ELPs, de peptides IKVAV/YIGSR et SNA15 ont révélé leur capacité à promouvoir l'angiogenèse et l'innervation. La supplémentation des matrices en HA leur confère des propriétés ostéoinductices puisqu'elles sont alors capables de former du tissu minéralisé et du tissu ostéoide.

En conclusion, la matrice composite contenant 2 % d'HA étant la plus performante en termes de néoformation osseuse, de néovascularisation et de génération de structures nerveuses, nous l'avons choisie pour les implantations en site osseux.

IV. Implantation de la matrice composite en site osseux.

La capacité de régénération de la matrice composite contenant 2 % d'HA a été évaluée chez le rat dans des modèles de défaut condylaire fémoral et de défaut mandibulaire.

4.1. Implantation dans le condyle fémoral de rat.

Des défauts circulaires de 3 mm de diamètre ont été réalisés au niveau des condyles fémoraux de rats. Trois conditions ont été testées : le défaut non comblé qui sera le témoin négatif, le défaut comblé avec notre matrice composite, et le défaut comblé avec la matrice commerciale Collapat® qui nous servira de contrôle positif.

4.1.1. Suivi de la minéralisation des matrices.

Des analyses de micro-CT ont été effectuées à différents temps après l'implantation (7, 15, 30 et 60 jours) pour assurer le suivi de la minéralisation des défauts condylaires. Les images 2D des condyles fémoraux reconstruits par micro-CT 3D sont présentés dans la Figure 14A, et la quantification du volume de tissu minéralisé par rapport au volume total (MV/TV) est présentée dans la Figure 14B.

Les images observées par micro-CT révèlent la formation d'un volume minéralisé dans les lésions comblées avec les matrices composites et le Collapat®, tandis qu'une minéralisation moins importante est détectée pour les défauts non comblés (Figure 14A).

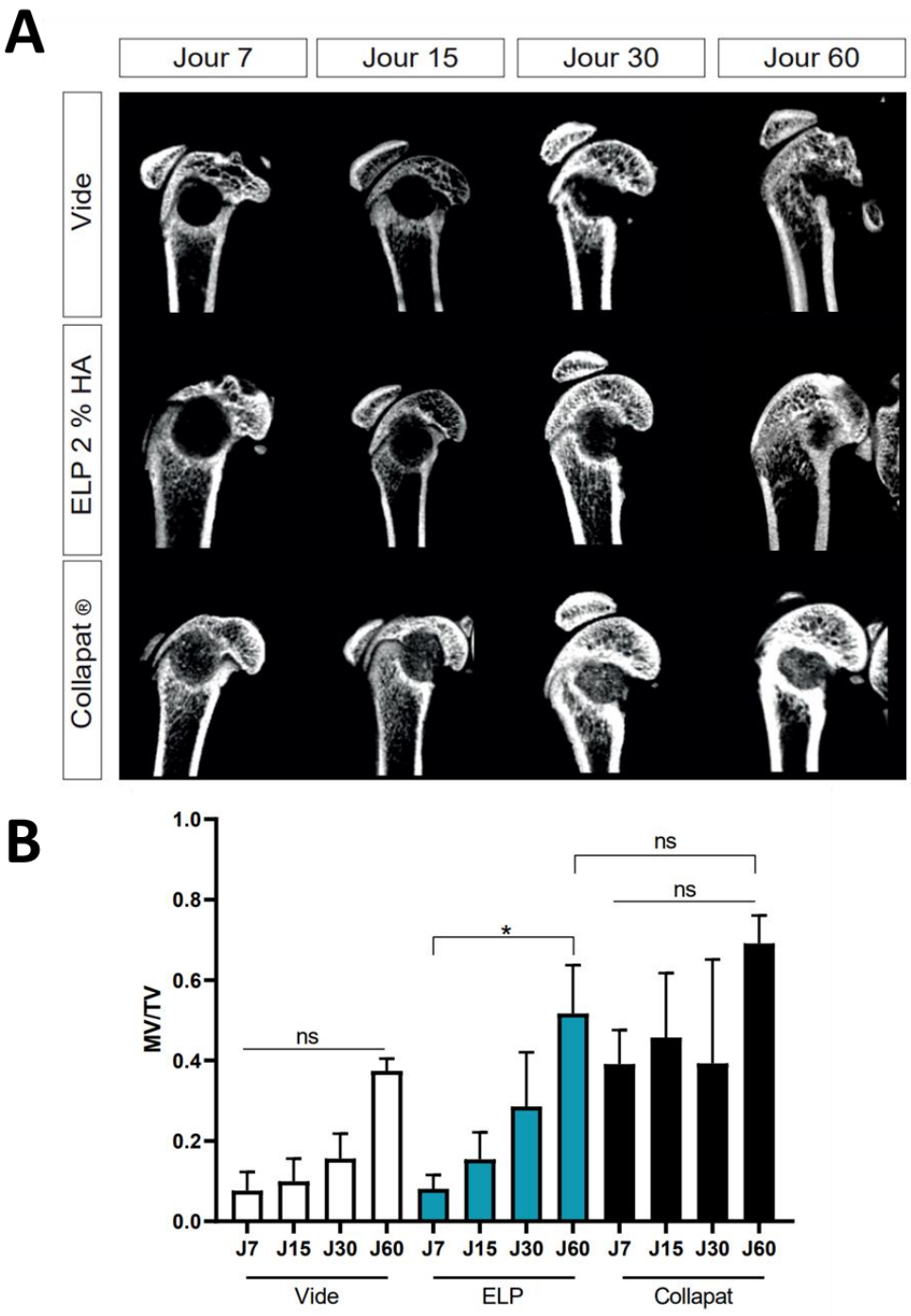


Figure 14 : Analyse par micro-CT de la minéralisation induite par les matrices composites dans un modèle de lésion osseuse du condyle fémoral chez le rat.

(**A**) Images micro-CT représentatives des lésions osseuses après 7, 15, 30 et 60 jours d'implantation et en fonction des groupes : lésion laissée vide, comblée avec les matrices ELPs contenant 2 % d'HA et le contrôle positif le Collapat®. (**B**) Le volume minéral/volume total (MV/TV) a été mesuré à partir d'images micro-CT tridimensionnelles reconstruites à l'aide du logiciel Microview® pour les trois groupes (vide, ELPs, Collapat®) et pour tous les temps d'implantation (J7, J15, J30 et J60). Analyse quantitative de la minéralisation avec un test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis avec p * < 0.1 et ns = non significatif.

Les résultats de l'analyse quantitative (Figure 14B) montrent qu'il y a une minéralisation partielle des défauts non comblés avec une augmentation non-significative du MV/TV en fonction du temps. À 7 jours, ce rapport est de de 8,6 % ± 4,8 % ; puis il augmente pour atteindre 10,3 % ± 5,6 % à 15 jours, 14,7 % ± 5,9 % à 30 jours et 37,5 % ± 3,0 % à 60 jours. Cependant, nous avons observé des fractures du site sur certains animaux, ce qui a compliqué la quantification du MV/TV. Nos précédents travaux avaient montré que des lésions osseuses de 2,8 mm de diamètre pouvaient se réparer naturellement (Schlaubitz *et al*. 2014). Dans notre cas, des lésions de 3 mm de diamètre ayant été réalisées, fragilisant probablement le site de lésion et provoquant des fractures qui ont retardé ou altéré la cinétique de réparation. Les images de micro-CT révèlent néanmoins une minéralisation en périphérie de la lésion, ce qui explique le rapport MV/TV élevé de la zone d'intérêt (ROI) (Figure 14B). Dans tous les cas ces images observées pour les lésions non comblées sont différentes de celles obtenues après implantation des matrices composites.

En effet dans ce cas nous observons une minéralisation qui s'initie par les bords internes de la lésion et qui augmente en fonction du temps post-implantation. La minéralisation est dans un premier temps essentiellement périphérique, puis évolue au cours du temps vers l'intérieur de la lésion. Après 60 jours d'implantation nous observons que la partie corticale s'est reformée contrairement à ce qu'on observe avec le défaut non comblé (Figure 14A). Les analyses quantitatives montrent que des valeurs de MV/TV augmentent de façon significative au cours du temps (Figure 14B). Elles sont de de 8,0 ± 3,9 % après 7 jours d'implantation ; 15,6 ± 7,0 % après 15 jours ; 28,8 ± 14,2 % après 30 jours pour atteindre 56,0 ± 6,9 % après 60 jours.

En ce qui concerne le matériau contrôle Collapat®, le MV/TV est de 40,2 ± 9,4 % dès le 7ème jour d'implantation ce qui est bien plus élevé que celui mesuré avec la matrice composite ELP/peptides/HA. Ce résultat était attendu dans la mesure où ce matériau commercial contient une teneur élevée en particules de phosphate de calcium, particules qui induisent un signal aux rayons X (Figure 14A). Nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la minéralisation de J7 à J30. Le rapport de MV/TV ne variant quasiment pas ou peu, le rapport MV/TV est de 67,3 ± 6,3 % après 60 jours.

Ainsi, si l'on compare les trois conditions étudiées on observe que la quantité de tissus minéralisés mesurée entre les jours 7 et 60, est multipliée par 4,4 dans les défauts non comblés, par 7,1 avec notre matrice composite et par 1,7 dans le cas du Collapat®.

4.1.2. Analyse histologique de la néoformation osseuse induite par les matrices composites.

7 jours, 15 jours, 1 mois et 2 mois après l'implantation, les fémurs ont été explantés, décalcifiés et des coupes histologiques ont été réalisées. Ces coupes ont ensuite été colorées au Trichrome de Masson (Figure 15).

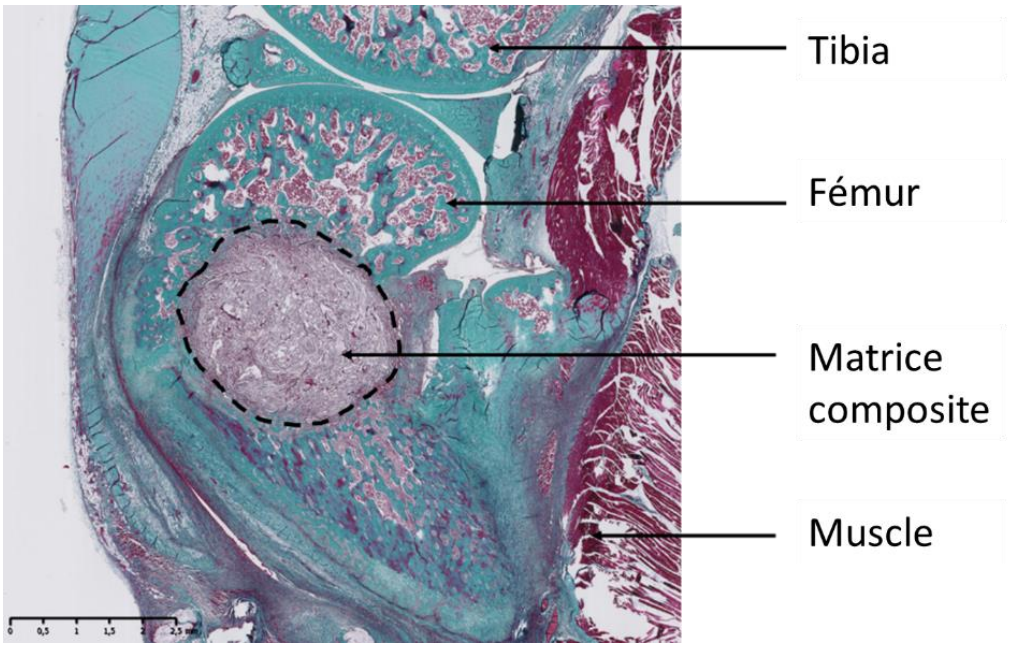


Figure 15 : Coupe histologique d'une lésion réalisée dans le condyle fémoral comblé avec la matrice ELP/peptides contenant 2 % d'HA. Coloration au Trichrome de Masson

Coloration au Trichrome de Masson d'une lésion osseuse comblée avec la matrice composite après 7 jours d'implantation. La zone correspondant à la lésion est délimitée par un cercle en pointillé en noir.

Les coupes histologiques des zones de lésions sont présentées dans la Figure 17A. Pour les lésions non comblées, la limite du défaut est toujours bien visible 7 jours après l'intervention. Après 15 jours, la lésion a été comblée par un tissu principalement collagénique. Au trentième jour, les limites de la lésion sont difficilement distinguables, et du tissu organisé de type osseux apparait en périphérie.

Les coupes histologiques montrent que les matrices composites ELP/peptides/HA se sont bien intégrées dans les défauts osseux. Il n'y a pas de délimitation visible entre la zone de lésion et le matériau. La présence de nombreux noyaux cellulaires à l'intérieur de la matrice confirme une colonisation cellulaire. De plus, l'absence de fibrose est un signe de la bonne biocompatibilité des matrices utilisées. La quantification du tissu ostéoïde nouvellement formé montre une augmentation à partir du 15ème jour, la quantité maximale étant mesurée au 30ème jour. À deux mois, la quantité de tissu ostéoïde avait cependant diminuée. L'analyse des coupes histologiques montre que la formation osseuse se produit de la périphérie vers le centre du défaut, ce qui confirme les images observées par micro-CT (Figure 14A).

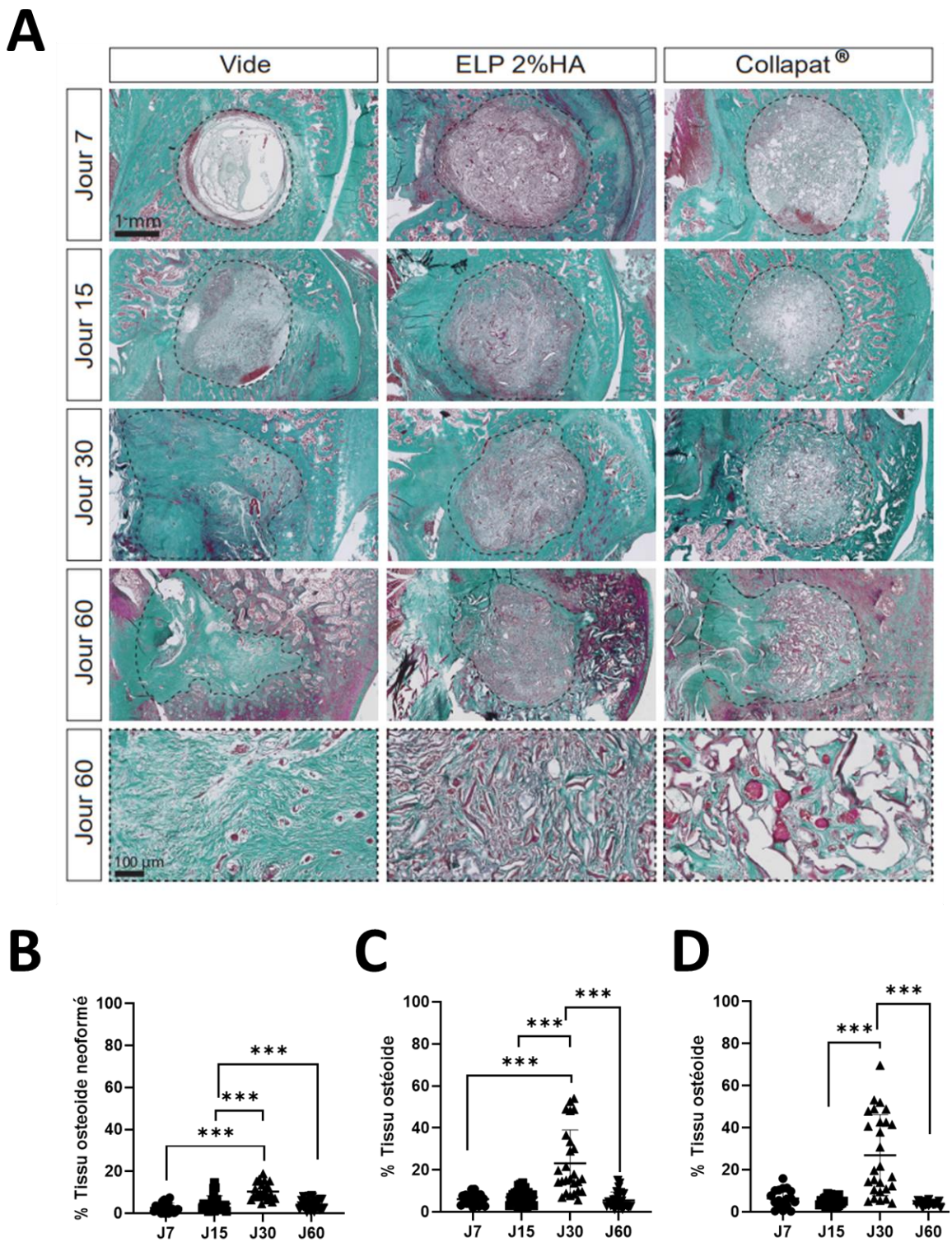


Figure 16 : Analyse de la néoformation osseuse par histologie des matrices composites dans un modèle de lésion osseuse du condyle fémoral de rat.

(**A**) Images représentatives de la coloration au Trichrome de Masson des lésions osseuses après 7, 15, 30 et 60 jours d'implantation en fonction des groupes : lésion laissée vide, comblée avec les matrices ELPs/peptides contenant 2 % d'HA ou comblée avec le Collapat®. **(B, C, D)** Quantification du tissu ostéoïde néoformé pour les trois groupes (vide, ELPs, Collapat®) et pour tous les temps d'implantation (J7, J15, J30 et J60). Analyse quantitative du tissu ostéoide avec un test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis avec p *** < 0.001.

Concernant le matériau Collapat®, une bonne ostéointégration a également été observée ainsi qu'une formation de tissu osseux de la périphérie vers le centre du défaut. La quantification du tissu ostéoïde nouvellement formé a également montré un maximun de néoformation après 30 jours, ce qui est comparable à la cinétique observée avec nos matrices composites. Les grossissements aux centres des défaut aux différents temps sont présentés dans la Figure S3 (paragraphe « Annexes »).

Pour observer spécifiquement la présence de cellules osseuses, nous avons réalisé des immunomarquages de l'ostéocalcine qui est un marqueur spécifique du tissu osseux (Figure 17). Les images montrent que les lésions non comblées présentent peu de cellules ostéoblastiques 7 et 15 jours après l'intervention. Après 30 jours, nous détectons quelques cellules ostéoblastiques en bordure de la zone délimitant la lésion osseuse.

Dans le cas des matrices composites et du Collapat®, l'ostéocalcine est détectée dès le 15ème jour, et sa présence est avérée aux 30ème et 60^{éme} jours, confirmant la présence de cellules ostéoblastiques dans les tissus néoformés.

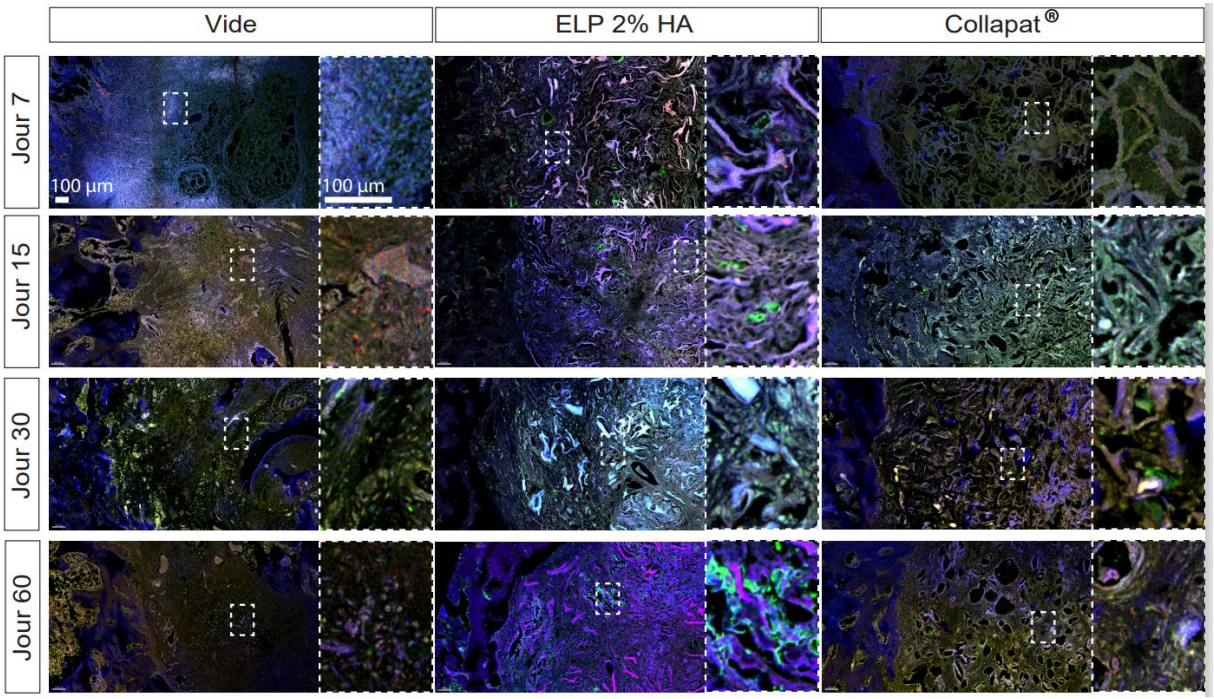


Figure 17 : Immunomarquage de l'ostéocalcine dans les tissus néoformés par les matrices implantées dans un modèle de lésion osseuse du condyle fémoral chez le rat.

Les immunomarquages du marqueur osseux osteocalcine (vert) et des noyaux cellulaires DAPI (bleu) ont été réalisés sur les coupes histologiques des tissu formés dans les lésions osseuses laissées vides, comblées par les matrices composites ou par le Collapat® après 7, 15, 30 et 60 jours d'implantation. Pour chacun des groupes, le défaut osseux entier est représenté sur l'image de gauche avec une barre d'échelle de 100 µm. Les images dans les encadrés sont des grossissements.

4.1.3. Vascularisation et innervation des défauts condylaires.

Pour évaluer la vascularisation et l'innervation dans les lésions condylaires, nous avons effectué une analyse des marqueurs vasculaires (Endomucine, Podocalyxine et Meca32) et neuronaux (β III tubuline) en utilisant la technique dite de transparisation de l'os entier. Cette analyse a permis de visualiser l'organisation des réseaux vasculaires et neuronaux dans la zone initialement lésée. Nous avons utilisé un marquage multiple pour faciliter la visualisation des échantillons épais, comme c'est le cas pour les os entiers (Kirst *et al*. 2020).

La Figure 18A montre une coupe 2D de la lésion comblée par la matrice composite contenant 2 % d'HA après 30 jours d'implantation. On peut voir le tissu osseux grâce à son autofluorescence (en vert), les réseaux vasculaires (en bleu cyan) et les prolongements neuronaux (en rouge).

La Figure 18B montre les images 2D obtenues pour chaque condition, 15 et 30 jours après l'implantation : lésions non comblées, lésions comblées avec les matrices composites ou avec le Collapat®.

Dans une lésion qui n'a pas été comblée, un réseau vasculaire s'est développé. Il semble provenir essentiellement des tissus périphériques musculaires. Après 30 jours, nous détectons des vaisseaux sanguins et des structures nerveuses à l'intérieur de la zone qui avait été lésée. Toutefois, l'analyse histologique par coloration au TM a montré que la partie lésée avait été comblée par un tissu mou, désorganisé, et riche en collagène.

Pour les lésions comblées avec les matrices composites, dès le quinzième jour nous avons observé la formation d'un réseau de vaisseaux sanguins dans l'intégralité de la matrice.

En revanche, pour les défauts comblés avec le Collapat® la vascularisation était principalement présente à la périphérie externe du défaut. De plus, cette vascularisation n'était visible qu'à partir du 30ème jour suivant l'implantation. Ces résultats qualitatifs montrent donc que la matrice Collapat® est moins efficace que notre matrice composite pour promouvoir la vascularisation de l'implant.

En ce qui concerne l'innervation, bien que la majorité des fibres soient présentes dans le périoste recouvrant la surface de l'os cortical, on peut voir quelques fibres à l'intérieur des lésions pour les défauts non comblés ou comblés avec la matrice composite. En revanche, aucune fibre nerveuse n'a été détectée quand les défauts condylaires avaient été comblés par le Collapat®.

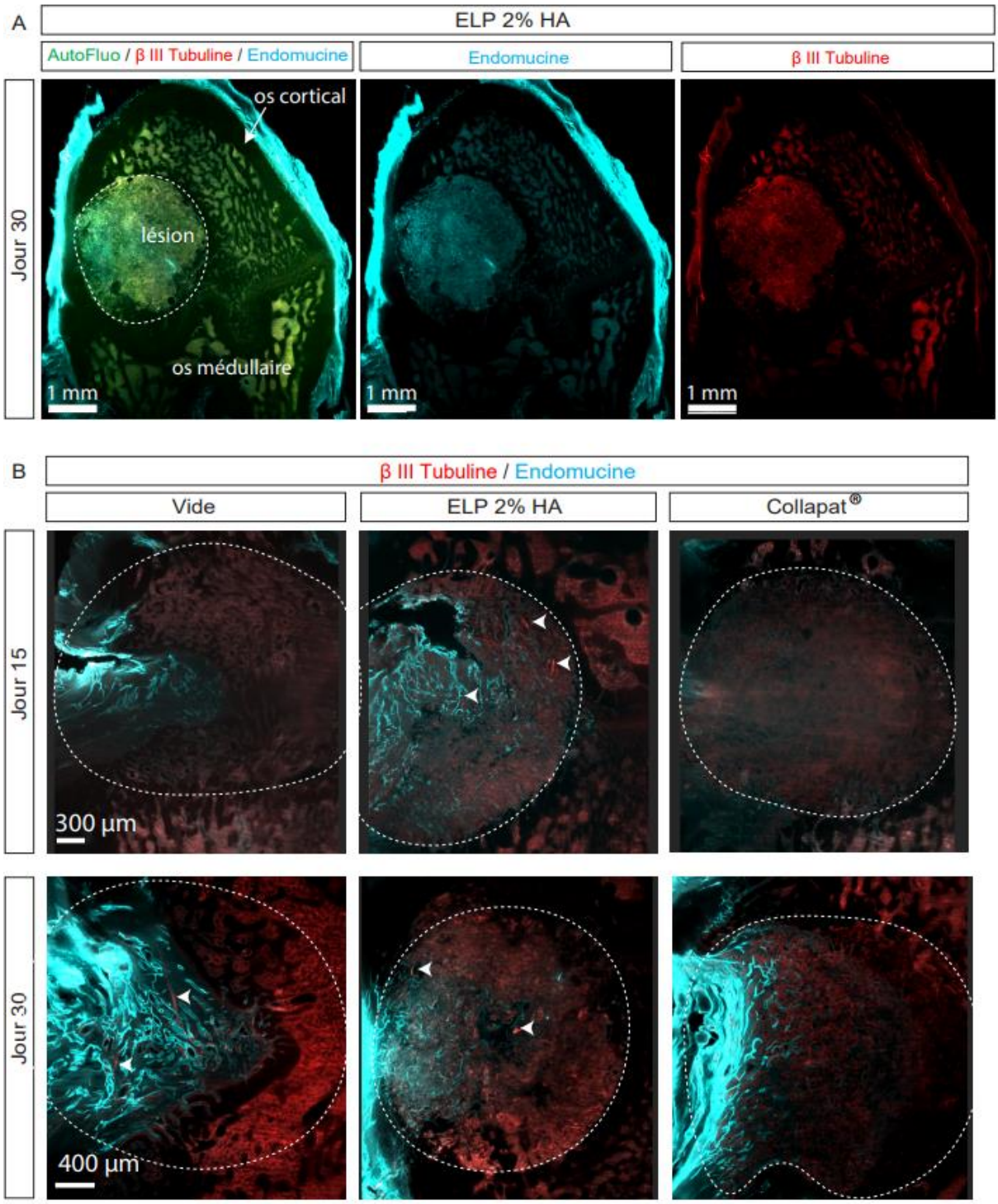


Figure 18 : Développement de réseaux vasculaires et présence de fibres nerveuses dans des défauts condylaires non comblés, comblés avec les matrices composites ou le Collapat®.

L'immunomarquage a été effectué 15 et 30 jours après l'implantation. Il met en évidence la présence de réseaux endothéliaux (Endomucine, Podocalyxine et Meca32, bleu cian) et neuronaux (β III tubuline, rouge). La couleur verte provient de l'autofluorescence endogène des tissus. **(A)** Condyle fémoral entier mettant en évidence l'os cortical et médullaire d'une lésion comblée par la matrice composite 30 jours après l'implantation. **(B)** Grossissement des défauts condylaires pour les trois groupes 15 et 30 jours après l'implantation: non comblé, matrice composite et Collapat®. Les flèches indiquent les structures nerveuses détectées. Un bruit de fond correspondant à l'autofluorescence endogène apparait pour chaque marquage.

4.2. Implantation de la matrice composite dans un défaut mandibulaire.

Afin d'évaluer l'utilisation du matériau développé pour la reconstruction osseuse crânio-faciale, nous avons choisi de créer un modèle de défaut osseux mandibulaire. Parmi les os du crâne seuls deux os sont mobiles, l'os hyoïde et la mandibule. La mandibule présente l'avantage d'être un os plus gros et facilement accessible.

Le défaut mandibulaire offre également l'avantage, par rapport aux défauts de calvaria classiquement utilisés pour tester les matériaux de réparation osseuse, d'être soumis à des contraintes mécaniques élevées. Or, ces contraintes mécaniques sont nécessaires à une réparation osseuse efficace (Anani & Castillo 2022). Au niveau de la mandibule, les contraintes sont essentiellement liées à la mastication. Nous avons donc choisi ce modèle de lésion mandibulaire pour tester les matériaux de réparation osseuse, car il est plus adapté à la réalité physiologique que le défaut de calvaria (Schlund *et al*. 2022).

Le défaut osseux mandibulaire a été réalisé pour la première fois au laboratoire BioTis lors de cette thèse. Pour valider ce modèle, une expérience préliminaire avait été menée. Un défaut circulaire de 3 mm de diamètre avait été créé, puis sa réparation avait été suivi par micro-CT. Après 3 mois, aucune réparation osseuse n'a été observée indiquant que le défaut réalisé est bien de taille critique.

Ce paragraphe présente les résultats préliminaires obtenus avec les matrices composites mais qui suscitent des perspectives très encourageantes.

4.2.1. Potentiel de minéralisation.

Des observations préliminaires en micro-CT ont été effectuées à différents temps après l'implantation (7, 15, 30 jours) pour suivre la minéralisation des défauts mandibulaires. Les images 3D des mandibules reconstruites par micro-CT comblée avec la matrice composite sont présentées dans la Figure 19.

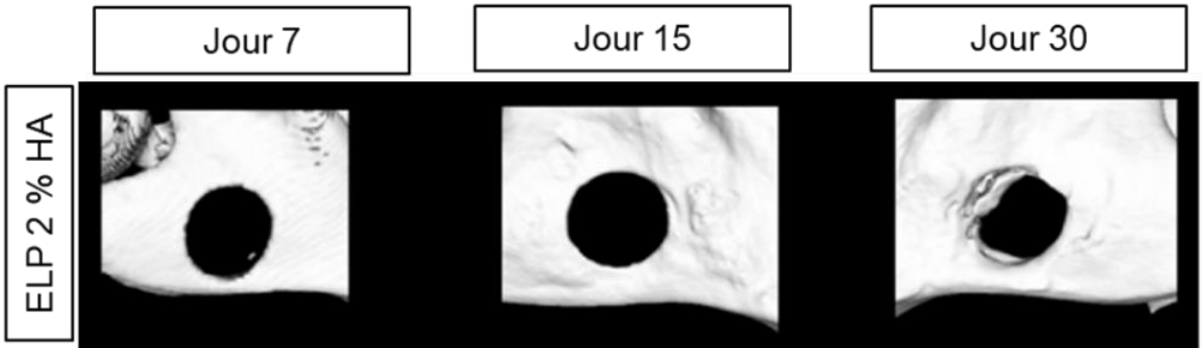


Figure 19 : Minéralisation de matrices dans le modèle de lésion mandibulaire.
Images micro-CT en 3D représentant la reconstruction du défaut mandibulaire en présence de la matrice composite.

Une reconstruction partielle en périphérie du défaut a est observée au 30ème jour. La quantification du MV/TV était de 0.037 ± 0.010 au jour 7 et de 0.040 ± 0.018 au jour 15, donc comparable. Ce n'est qu'au 30ème jour que nous avons mesuré un rapport MV/TV en légère augmentation (0.094 ± 0.049).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'évolution du rapport MV/TV est bien plus lente dans ce défaut mandibulaire que dans le défaut condylaire et ce pour des temps courts d'analyses. Des temps plus longs d'implantations seront requis pour évaluer la capacité de la matrice composite à régénérer la totalité de la lésion.

4.2.2. Analyse histologique de la néoformation osseuse induite par les matrices composites.

Dans ce paragraphe, seules les colorations au TM des coupes histologiques obtenues après 15 jours d'implantation de la matrice composite sont présentées (Figure 20).

La Figure 20A permet de localiser la lésion dans son environnement tissulaire après explantation de la mandibule de rat, et de visualiser la zone qui a été étudiée après coloration au TM (Figure 20B, 20C et 20D).

De façon très intéressante, nous observons à la jonction de l'os et de la matrice, une zone mettant en évidence la présence de tissu osseux néoformé (Figure 20B) avec la présence de cellules ostéoblastiques bordantes (Figure 20C, 20D), des logettes avec des ostéocytes au sein d'une structure osseuse qui semble lamellaire (Figure 20C, 20D). Des vaisseaux sanguins sont également visibles dans le tissu néoformé (Figure 20C, 20D).

Par ailleurs, si l'on considère la reconstruction du tissu de la périphérie au centre de la lésion, il est important de noter l'invasion tissulaire qui s'accompagne de vascularisation mais aussi de formation de tissu osseux au contact de la matrice, confirmant leur potentiel ostéoconducteur.

Ces résultats préliminaires nous amènent à poursuive les travaux sur ce modèle de lésion mandibulaire, avec des temps longs d'implantation et une analyse fine de la vascularisation et de l'innervation des tissus.

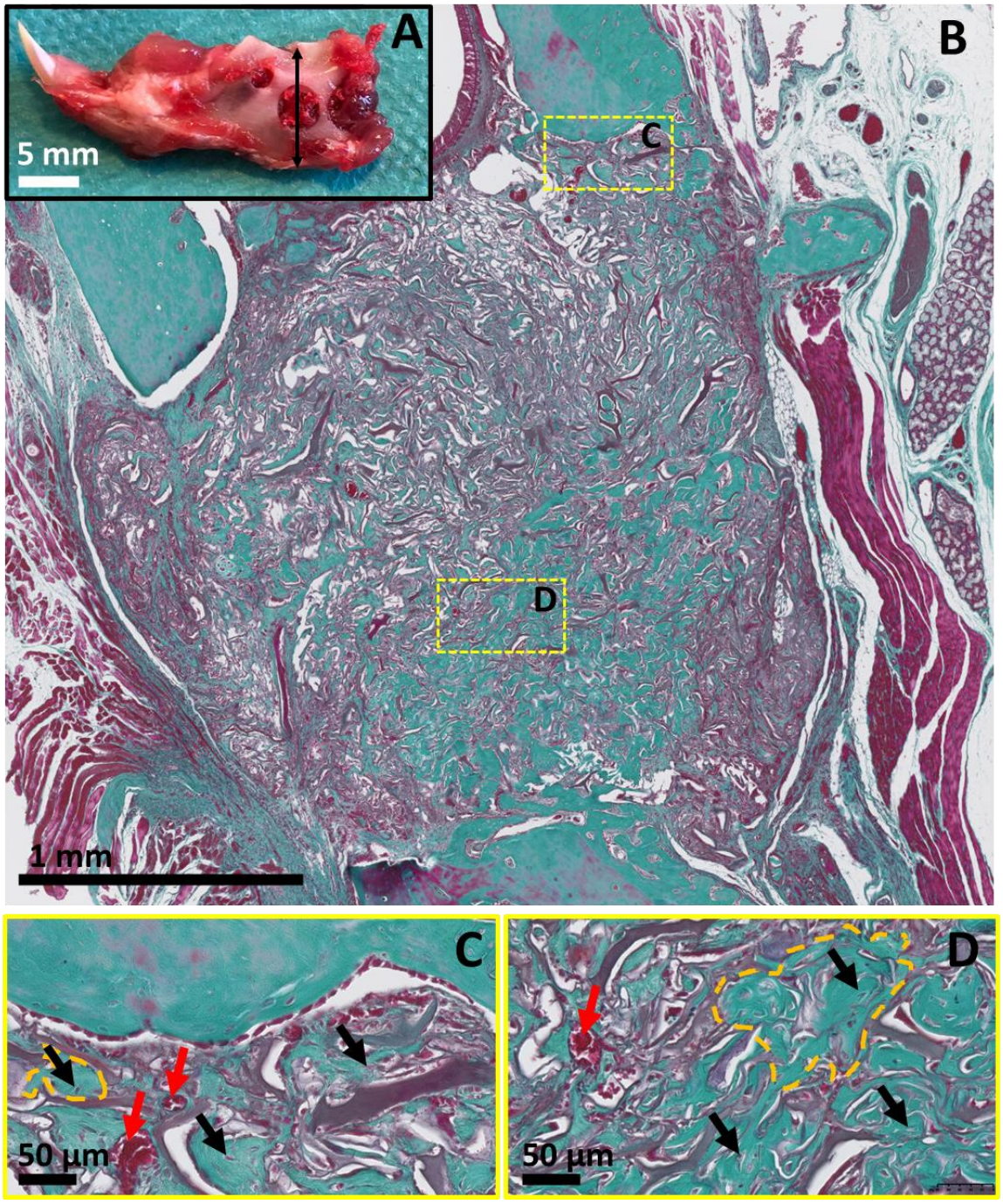


Figure 20 : Coupes histologiques du matériau ELP 2 % HA implanté dans un défaut mandibulaire au jour 15.

(**A**) Photo représentant une mandibule entière ainsi que le défaut circulaire associé, la double flèche indique le sens dans lequel les coupes histologiques ont été réalisées. (**B**) Coupe histologique colorée au TM montrant le matériau ELP 2 % HA dans sa globalité. (**C**) Grossissement au niveau de la limite du défaut et (**D**) au sein du matériau. Les flèches rouges montrent la présence de vaisseaux sanguins. Les flèches noires indiquent la présence de cellules ostéocytaires entravées dans une matrice osseuse de type lamellaire (quelques exemples de ces zones sont délimités par les pointillés oranges).

V. Conclusion.

Dans ce chapitre, différents matériaux composites ont été testés *in vivo* chez le petit animal en site ectopique et orthotopique.

Les implantations sous-cutanées ont permis de choisir la matrice possédant les meilleures caractéristiques pour l'implantation en sites osseux. Toutes les matrices testées se sont bien intégrées dans les tissus environnants, et elles n'ont pas induit de réaction inflammatoire majeure. Nous avons également montré que les matrices contenant de l'HA induisaient une minéralisation. Les structures vasculaires ont envahi les implants démontrant leur potentiel angiogénique. La capacité des matrices à stimuler l'innervation a également été démontrée par la présence de nerfs à la périphérie du matériau, en particulier aux stades précoces suivant l'implantation.

La matrice contenant 2 % d'HA a été sélectionnée pour sa capacité à promouvoir la minéralisation ainsi que pour son potentiel angiogénique. Elle a été implantée dans des défauts osseux condylaires et mandibulaires.

La reconstruction osseuse a été améliorée après implantation des matrices composites dans un défaut condylaire comparativement à ce qui s'est produit dans un défaut non comblé. Des structures osseuses organisées exprimant l'ostéocalcine ont été identifiées dans ces hydrogels. Un réseau vasculaire organisé s'est développé dans l'entièreté de la lésion osseuse, ce qui n'a pas été le cas pour le matériau contrôle Collapat®.

Les résultats préliminaires obtenus dans le modèle de défaut mandibulaire montrent des résultats très encourageants sur les propriétés ostéoconductrices et angiogène des matrices composites. Les analyses histologiques ont montré que les matériaux se sont bien intégrés. Des structures osseuses et vasculaires ont été retrouvées dès 15 jours d'implantations. Ces résultats demandent à être confirmés sur des temps plus longs, accompagnés d'une étude de l'innervation des tissus.

VI. Annexes.

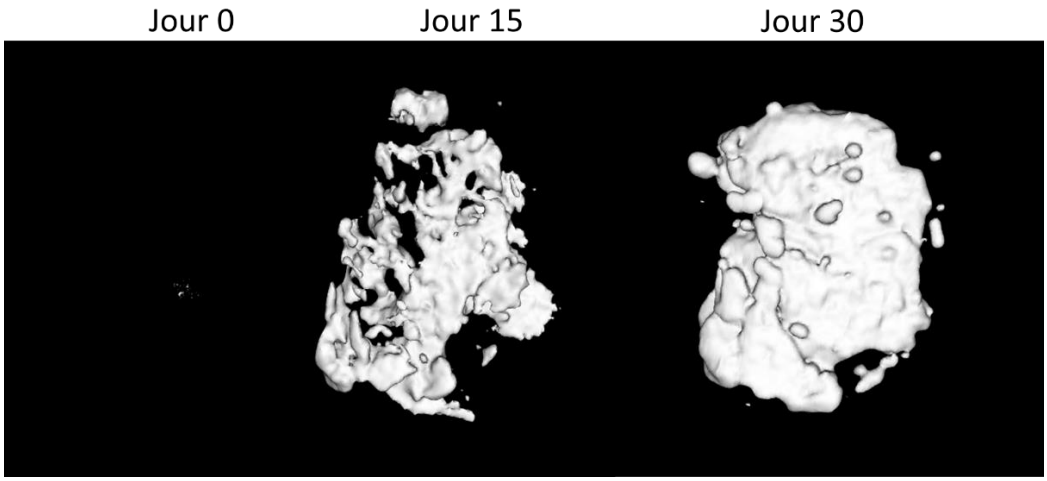


Figure S1 : Suivi de la minéralisation par micro-CT de la matrice ELPs contenant 2 % (m/v) HA implantée en sous-cutané avec le logiciel MicroView®.

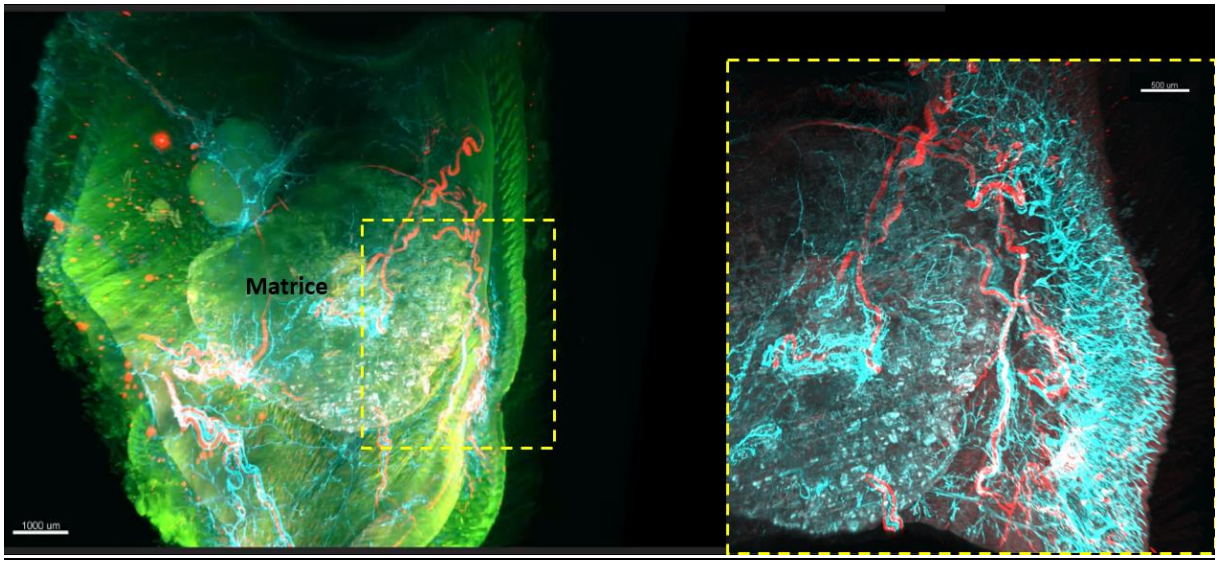


Figure S2 : Réseaux neuronaux et vasculaires en 3D développés au sein de la matrice composite contenant 2 % d'HA après 1 mois d'implantation en site sous-cutané.

Les tissus périphériques et la matrice ont été « transparisés » et immunomarqués pour l'endomucine (Bleu) et la β III tubuline (rouge). En vert est représenté l'autofluorescence endogène des tissus et de la matrice. Barre d'échelle à gauche = 1 mm, à droite = 500 µm.

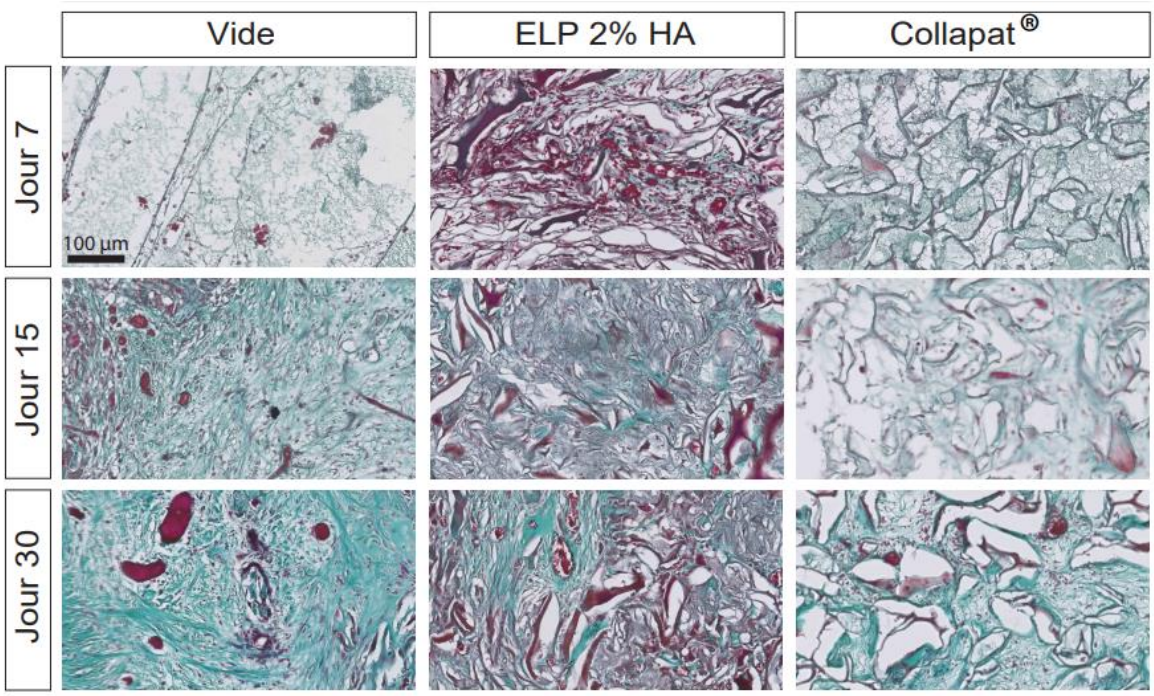


Figure S3 : Grossissement des images présentées dans la Figure 17.
Analyse de la néoformation osseuse dans un modèle de lésion osseuse du condyle fémoral chez le rat.

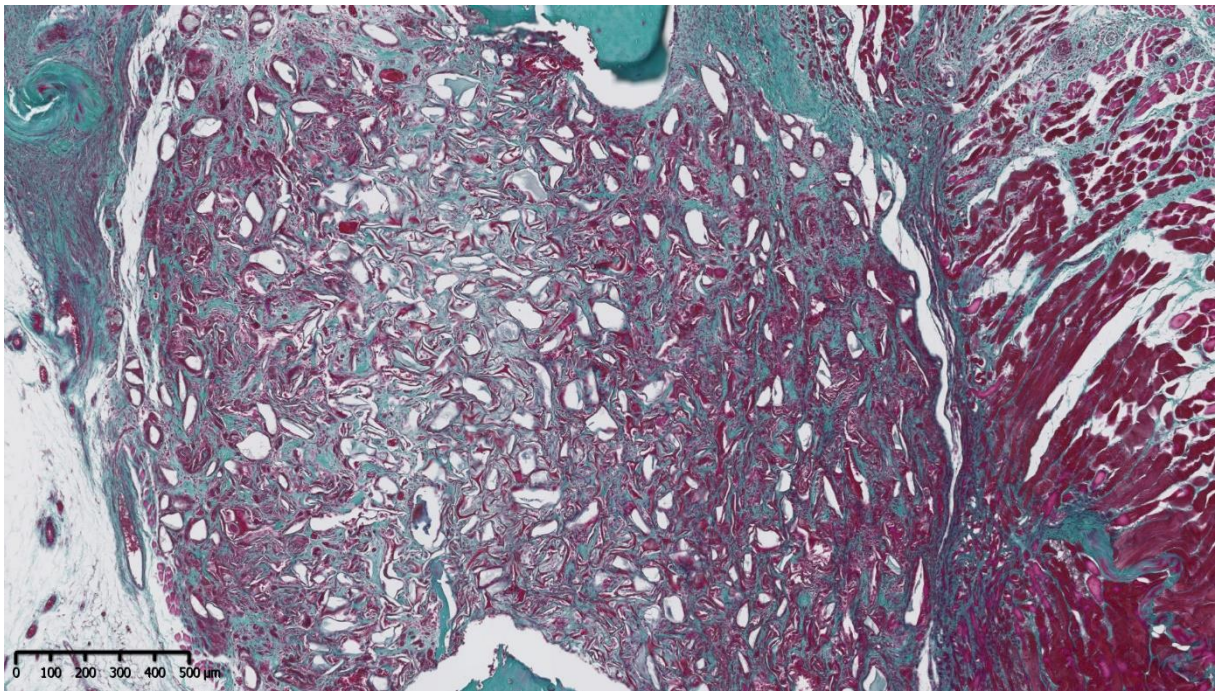


Figure S4 : Coupe histologique du matériau Collapat® implanté dans un défaut mandibulaire au jour 15.

Conclusions

et

Perspectives

Le traitement des défauts osseux de taille critique reste un problème non résolu à ce jour. Pour y remédier, de nouvelles approches sont utilisées afin de développer des matériaux de comblement synthétiques standardisés et prêts à l'emploi de manière à faciliter leur utilisation par le praticien. L'essentiel des stratégies visent à promouvoir la formation osseuse et la formation d'un réseau vasculaire au sein de ces matériaux afin d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires à la viabilité cellulaire. De nombreux travaux ont utilisé l'addition de cellules et/ou de facteurs de croissance aux substituts osseux pour améliorer le processus de régénération. Toutefois, l'utilisation de cellules ou de facteurs de croissance pose un certain nombre de problèmes dans les applications thérapeutiques. Parmi les limites de ces produits d'ingénierie tissulaire, on peut citer la faible disponibilité des cellules chez les patients âgés ou souffrant de pathologies ostéoarticulaires. De plus, quand les cellules sont prélevées chez le patient, le temps nécessaire à leur amplification pour en obtenir une quantité suffisante peut ne pas être compatible avec la stratégie de réparation. Une solution résiderait dans l'utilisation de banques de cellules souches pluripotentes induites (iPSC), mais les applications cliniques restent à ce jour limitées. En ce qui concerne les facteurs de croissance, la difficulté réside dans le choix de la concentration à délivrer, ou encore dans leur mode de délivrance pour assurer une efficacité optimale. En effet, pour chaque facteur de croissance il y a une concentration optimale au-delà de laquelle il existe un risque de prolifération cellulaire anormale. En revanche, si les concentrations sont trop faibles leur apport au processus de réparation devient négligeable. Enfin, il a également été montré que les cellules et les facteurs de croissance peuvent diffuser hors du site à réparer, ce qui peut provoquer des effets secondaires indésirables tels que le développement de cancers (Carragee *et al*. 2013).

Pour toutes ces raisons, nous avons fait le choix de développer une matrice qui ne contient pas de cellules ni de facteurs de croissance. En revanche, nous avons choisi d'y greffer de façon covalente des séquences de peptides bioactifs pour permettre la colonisation du biomatériau par les cellules de l'hôte. L'un de ces peptides, YIGSR, a été choisi pour sa capacité à interagir avec les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'angiogenèse. Le peptide IKVAV, présent dans la séquence de la laminine humaine, a été sélectionner pour sa capacité à stimuler la neurogenèse. En effet, il est connu depuis plusieurs années que le SNP participe au développement osseux, (Edoff *et al*. 1997). L'utilisation d'un peptide stimulant la neurogenèse est donc une des originalités de ce travail puisque les matériaux actuellement développés pour la réparation osseuse négligent souvent le rôle du système nerveux. Enfin, nous avons également choisi d'ajouter un composé minéral à notre matrice pour mimer la nature du tissu osseux, sous formes de particules d'hydroxyapatite, ainsi qu'un peptide appelé SNA15 dont le rôle est de fixer le calcium. Dans ce contexte l'objectif de cette thèse a été de développer un

matériau prêt à l'emploi, de nature composite, capable de promouvoir l'angiogenèse, l'innervation et la régénération osseuse.

Développement d'un nouveau polymère recombinant : l'ELP M80.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons mis en place un système de production et de purification d'un polymère dérivé de l'élastine. Ce polymère, nommé ELP M80, est un polypeptide recombinant composé de 80 répétitions du motif VPGXG. Sa séquence en acide aminé est la suivante : **M**W[(VPG**V**G)(VPG**M**G)(VPG**V**G)$_2$]$_{20}$. Il contient donc 21 méthionines qui ont ensuite été modifiées post-traductionnellement par voie chimique. Sa masse moléculaire est de 33 739 Da et nous avons déterminé que sa Tcp est de 27,3 °C pour une concentration de 100 µM en tampon Tris. Une fois le clone bactérien obtenu et validé, la production de cet ELP a été confiée à la société TPNBT (Technical Proteins NanoBioTechnology) qui possède les infrastructures pour une production à grande échelle (fermenteurs de 100 litres). Cette possibilité de monter en échelle montre que les ELPs pourront être produits en quantité suffisante pour des applications en ingénierie tissulaire, en délivrance de médicaments (Levêque *et al*. 2022a) ou pour fabriquer des biomatériaux (Dos Santos *et al*. 2019).

Les résidus de méthionine des ELPs ont ensuite été modifiés par réaction de thioalkylation chimiosélective pour y introduire des fonctions alcènes (Petitdemange *et al*. 2017). Au total, 20 méthionines ont été fonctionnalisées par ELP. Cette insertion de groupement alcène était un préalable à la formation des hydrogels par réaction thiol-ène telle que précédemment décrite par Dos Santos et ses collaborateurs (Dos Santos *et al*. 2019).

De manière inattendue, cette modification chimique a conduit à la perte de la thermosensibilité de l'ELP M80-alcène, empêchant ainsi l'utilisation de la propriété de thermosensibilité qui aurait pu améliorer les propriétés rhéologiques des matériaux développés. La propriété de thermosensibilité de l'ELP alcène a pu être restaurée par une réaction de déméthylation, ce qui a conduit au polymère d.ELP M80-alcène (Rosselin *et al*. 2019).

Dans cette étude, les ELPs fonctionnalisés ont été utilisés pour former des hydrogels chimiques par réaction thiol-ène. Les analyses rhéologiques n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les gels constitués d'ELP M80-alcène ou de sa forme déméthylée. Ces résultats suggèrent que la réticulation des ELPs entraîne la perte de thermosensibilité, en tout cas dans nos conditions expérimentales. Sachant que la thermosensibilité des ELPs est lié à leur capacité à changer de conformation entre leur forme soluble (chaîne hydratée de conformation aléatoire) et leur forme insoluble (chaîne plus déshydratée, formation de feuillets béta, interaction hydrophobes inter-chaînes), on peut émettre l'hypothèse que la formation de nombreuses liaisons covalentes inter-chaînes après l'étape de réticulation empêche le changement conformationnel dépendant de la

température. Ainsi, si dans le futur nous souhaitons utiliser les propriétés de thermosensibilité dans des matériaux à base d'ELPs, il serait préférable de viser des hydrogels physiques dans lesquels les polypeptides ne seront pas, ou peu, réticulés. De tels hydrogels ont déjà été développés pour la régénération des tissus mous comme la peau (Rodríguez-Cabello *et al*. 2018) ou le tissu nerveux (Johnson & Koria 2016).

Formulation de la matrice développée à base d'ELP M80-alcène.

La matrice a été améliorée par rapport à celle décrite et développée par Dos Santos et ses collaborateurs (Dos Santos *et al*. 2019). Cette précédente formulation était en effet composée d'ELPs de plus faible masse moléculaire (ELP M40), du peptide IKVAV et de PEG. Nos objectifs étaient (i) d'éliminer le PEG qui permettait uniquement d'apporter des propriétés rhéologiques compatibles avec le tissu à restaurer ; (ii) d'utiliser des ELPs de plus grande taille pour obtenir un plus grand nombre de points de réticulation et ainsi compenser l'absence du PEG ; (iii) de créer des pores au sein de la matrice afin de permettre la colonisation cellulaire ; (iv) d'utiliser un nouveau peptide d'ancrage cellulaire contenant les motifs IKVAV/YIGSR pour augmenter le recrutement des cellules neuronales et vasculaires et (v) d'insérer une composante minérale, l'hydroxyapatite (HA) connue pour ses propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices.

Les matrices développées durant cette thèse sont donc dépourvues de PEG, et la longueur et le nombre de points de réticulation ont été doublés par l'utilisation de l'ELP M80 pour obtenir des caractéristiques rhéologiques satisfaisantes. Des pores ont été créés par « *ice-templating »* et lyophilisation. La porosité obtenue était suffisante pour permettre l'invasion cellulaire (Marrella *et al*. 2018). La difficulté dans le développement d'hydrogel microporeux reste l'équilibre entre la porosité optimale et les propriétés mécaniques requises pour réparer le site lésé. L'apport d'une phase minérale contribue sans aucun doute à l'amélioration des propriétés mécaniques des hydrogels composite, mais ce paramètre n'a pas été étudié dans notre étude. Par contre, nous avons montré que la présence d'HA avait une influence directe sur le diamètre moyen des pores, la concentration en HA étant inversement corrélée à la taille des pores. Les expériences de diffusion du FITC-Dextrane ont montré que les pores étaient interconnectés au sein des matrices, et donc que l'environnement tridimensionnel était favorable à la diffusion des nutriments, de l'oxygène, et permettait la colonisation cellulaire et la vascularisation du matériau composite.

La formulation des matrices développées a été optimisée pour aboutir à une concentration finale en ELP et peptides de 3 %, et une concentration maximale en HA de 2,5 %. La distribution homogène des particules d'HA au sein des matrices a été rendue possible grâce au peptide SNA15 dérivé de la

statherine salivaire. La quantité d'HA était en effet de 8 à 12 fois supérieure en présence du peptide SNA15. Une répartition homogène des particules d'HA dans les matrices était essentielle pour obtenir de façon reproductible des hydrogels présentant les mêmes propriétés. En effet, nous avons par exemple observé une grande variabilité dans les résultats obtenus après implantation de la matrice Collapat® *in vivo*, notamment en termes de minéralisation, et nous avons attribué cette variabilité à un manque d'homogénéité dans la répartition des particules d'HA dans ce matériau.

Par ailleurs, si on revient sur le choix de la concentration en HA sélectionnée pour développer la matrice composite, de nombreux travaux de la littérature décrivent des matériaux constitués par des concentrations plus élevées en HA, jusqu'à 30 %. Dans notre travail, les matrices développées ne contiennent qu'une faible concentration en HA. Nous avons montré par des analyses de TGA que la capacité de rétention des particules d'HA dans les hydrogels était au maximum de 2,5 % d'HA. Les essais biologiques et expérimentaux réalisés dans les Chapitres 3 et 4 de ce manuscrit ont révélé le potentiel ostéoinducteur des matrices supplémentées avec des concentrations inférieures à 2,5 % de HA. Un des intérêts d'utiliser de faible concentration en HA est l'absence de signal aux rayons X de la matrice composite, ce qui permet de suivre la minéralisation et la reconstruction osseuse par micro-tomographie aux rayons X après son implantation. Un tel suivi par radiographie n'est par exemple pas possible avec des matériaux à base de phosphate de calcium comme le BioOss® ou le Collapat®.

Les matrices à base d'ELP M80-alcène, de peptide IKVAV/YIGSR, de peptide SNA15 et d'HA ont été brevetées sous les numéros FR1851770 et WO2019166594. À ce jour, la méthode de fabrication des matrices n'est pas complétement standardisée. Si toutes les étapes de fabrication des matrices composites ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, nous ne pouvons toutefois pas mesurer précisément ni le taux de réticulation, ni la quantité de peptides (IKVAV/YIGSR et SNA15) liés de manière covalente à la matrice. D'autre part, comme décrit dans la revue de la littérature la pression utilisée par le lyophilisateur peut influer sur le nombre et la taille des pores (Autissier *et al*. 2010). Nous avons jusque-là utilisé deux lyophilisateurs identiques (Benchtop Pro, SP Scientific®, Modèle BTP-9EGEVX), mais un changement de matériel pourrait modifier les caractéristiques de notre matériau. Bien entendu, cela devra être évalué avant d'envisager une éventuelle commercialisation.

Une autre étude à mener concerne les méthodes de conservation et de stérilisation de nos matrices composites. Les hydrogels ont été systématiquement préparés sous PSM, et ont été implantés au plus tard un mois après leur fabrication. D'autre part, les gels ont été réticulés sous lumière UV (à 305 nm) pendant 8 minutes, ce qui pourrait éliminer en partie les éventuels microorganismes contaminants (Jang *et al*. 2022). Les matériaux ayant également été lyophilisés, leur conservation devrait être améliorée puisque les micro-organismes ne peuvent proliférer en absence d'eau, et que la plupart des

réactions protéolytiques sont ralenties en milieu anhydre. Par ailleurs, les produits lyophilisés peuvent être stockés pendant de longues périodes à température ambiante, ce qui facilitera leur utilisation en milieu hospitalier. Néanmoins, des méthodes de stérilisation sont requises par les normes ISO pour les matériaux biologiques, comme la congélation, l'irradiation γ, ou l'utilisation d'éthylène oxyde. Il nous faudra tester ces méthodes pour voir celle qui donne les meilleurs résultats sans affecter les propriétés structurelles, mécaniques et biologique de notre matériau composite (Delgado *et al*. 2014).

Biocompatibilité et résultats in vitro.

Tout développement de nouveaux biomatériaux ou de dispositifs médicaux, requiert une étude de leur biocompatibilité et cytotoxicité. Dans ce travail, le comportement de trois types de cellules a été étudié. Elles ont été choisies en fonction de leur intérêt pour l'ingénierie tissulaire osseuse : (i) les MSCs en raison de leur potentiel de différenciation en cellules osseuses, (ii) les ECs en raison de leur rôle central dans l'angiogenèse et (iii) les NS pour démontrer leur capacité à proliférer et à développer des neurites. Nous avons montré que les matrices à base d'ELP M80-alcène n'étaient pas cytotoxiques pour ces cellules. La présence du peptide d'adhésion IKVAV/YIGSR n'a pas eu d'effet majeur sur la prolifération et la viabilité des MSCs et des ECs. À l'opposé, la présence de ce peptide IKVAV/YIGSR a favorisé la croissance des neurites des NS.

Nous avons utilisé un seul peptide linéaire contenant chacun des deux motifs IKVAV et YIGSR, ce qui ne nous a pas permis de discriminer l'influence de l'un par rapport à l'autre. Ce choix a été fait afin d'avoir une longueur de peptide identique entre IKVAV/YIGSR et SNA15. En effet, lors de l'étape de réticulation avec l'ELP M80 alcène, ces peptides ont servis de molécules de liaison entre les polypeptides. En utilisant des peptides qui auraient eu des tailles différentes (du simple au double dans notre cas) nous redoutions d'avoir des problèmes d'homogénéité dans le maillage et/ou la structure des hydrogels après l'étape de réticulation. D'autre part, le fait d'avoir forcément un rapport 1/1 entre les séquences IKVAV et YIGSR limitait grandement la variabilité qui aurait pu apparaitre si ces deux séquences avaient été physiquement distinctes. Nous avons alors considéré que notre système était déjà suffisamment complexe et qu'il n'était pas nécessaire d'y ajouter cette variable.

Dans cette thèse, nous n'avons pas étudié de façon détaillée l'effet du peptide IKVAV/YIGSR sur l'expression des gènes spécifiques des trois types cellulaires (MSCs, ECs, NS). Seule une étude qualitative de l'activité de la phosphatase alcaline, marqueur des MSCs, a été réalisée. Les résultats suggèrent que la présence des peptides et de l'hydroxyapatite stimule la minéralisation de la matrice extracellulaire. Nous avons également montré que ces matrices composites fonctionnalisées ne modifiaient pas l'activité métabolique des MSCs (comparativement au ECs), ni leur prolifération

cellulaire. Ces résultats suggèrent que l'effet du peptide IKVAV/YIGSR sur les MSCs se traduirait préférentiellement sur la différenciation des cellules vers la voie osteogénique. Seule une analyse quantitative de l'expression des marqueurs de différenciation ostéogénique (Runx 2, ostéopontine, ostéocalcine) pourra permettre de confirmer cette hypothèse. Des études précédemment menées au laboratoire avec une autre formulation de matrices d'ELPs, dépourvues de particules de phosphate de calcium et fonctionnalisées avec le peptide IKVAV seul, avaient montré une surexpression des ARNm codant les marqueurs ostéogéniques *Bmp2* et *Osx*, ainsi qu'une stimulation de l'expression du marqueur *Tek* dans les ECs (Dos Santos *et al*. 2019). Dans notre étude, nous n'avons pas réussi à isoler des quantités d'ARNm suffisantes pour réaliser une étude transcriptomique. De faibles quantités d'ARNm n'ont pu être purifiées qu'à partir des matrices ne contenant pas d'HA, mais pas dans les autres cas. L'explication pourrait être qu'une interaction électrostatique entre les ARN et les particules de phosphate de calcium empêche leur extraction. Pour pallier ce problème il serait envisageable de travailler sur des matrices plus grandes sur lesquelles nous pourrions ensemencer plus de cellules. Une autre alternative serait d'étudier le protéome des cellules cultivées sur nos matrices composites.

Dans ce même contexte, il y aura lieu d'analyser et quantifier la présence de réseaux vasculaires induits par IKVAV/YIGSR, ainsi que l'expression des marqueurs endothéliaux tels que les facteurs CD31, VE-Cadherine, ou angiopoïétine.

Les études *in vitro* pourraient être améliorées en utilisant un modèle de chambre de coculture en 3D développé conjointement entre le laboratoire BioTis et le laboratoire LOF (Solvay, CNRS et Université de Bordeaux–UMR 5258). Cette chambre de coculture est composée d'un compartiment central destiné à recevoir les matrices 3D, et de compartiments latéraux séparés par des micro-canaux pouvant accueillir différents types cellulaires (Schéma 1). Dans notre cas, les micro-canaux permettraient le passage des neurites des NS vers le compartiment central, ce qui leur permettraient d'interagir avec les autres types cellulaire et/ou la matrice tout en maintenant les corps cellulaires séparés. Ce type de montage expérimental serait alors plus proche du processus d'innervation tel qu'il se passe lors de la réparation osseuse.

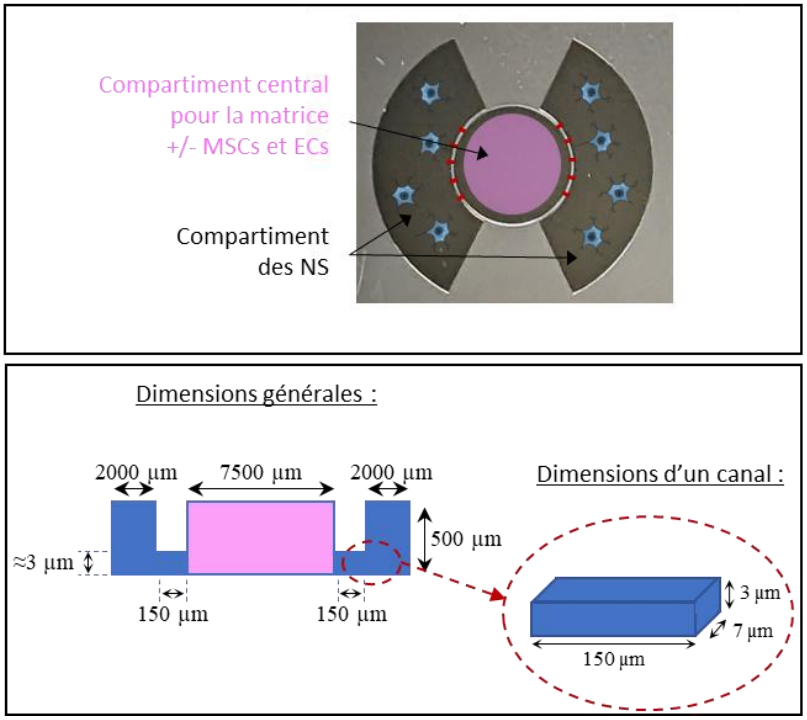


Schéma 1 : Chambre de coculture développée permettant de mimer le microenvironnement physiologique *in vivo*.

Cette chambre de co-culture permet de cultiver chaque type cellulaire dans le milieu de culture qui lui est propre et de récupérer chaque type cellulaire de manière indépendante.

Durant cette thèse nous n'avons pas démontré l'intérêt d'avoir intégré la séquence PVGLIG dans le peptide IKVAV/YIGSR pour ce qui est de la dégradation des implants. Des expériences préliminaires ont été réalisées avec la Protéinase K qui est une enzyme protéolytique non spécifique et à large spectre, et la MMP2 qui est une protéase qui clive spécifiquement la séquence PVGLIG (Fonseca *et al*. 2014; Kumada *et al*. 2010). Dans les deux cas, nous avons mesuré une perte de masse du matériau et nous avons détecté la libération d'amines primaires. Ces expériences ont montré que le matériau sans HA était plus facilement dégradé que le matériau qui en contenait 2,5 %, suggérant que la phase inorganique pourrait soit empêcher la reconnaissance des sites de coupures (encombrement stérique), soit inhiber l'activité enzymatique des deux protéases. Toutefois, il est à noter que les protocoles n'ont pas été optimisé et qu'il nous reste donc à terminer cette étude de dégradation.

Implantations des matrices en sous-cutané.

Pour étudier le potentiel ostéogénique, angiogénique et d'innervation des matrices développées pour la réparation osseuse, il est d'abord nécessaire de les implanter en site ectopique, puis en site orthotopique. Un site ectopique, sous-cutané ou intramusculaire, est un site dans lequel aucune

formation osseuse n'est possible en conditions physiologiques. Les différentes formulations d'hydrogels ont été implantées en site sous-cutané chez le rongeur. Ces matrices différaient dans leur concentration en HA.

L'imagerie par la technique de micro-CT a montré que les matrices contenant des particules d'HA permettent la formation d'une minéralisation ectopique. Après 30 jours d'implantation, la matrice contenant 2 % HA a montré le niveau de minéralisation le plus élevé.

Les matrices implantées ont provoqué une faible inflammation, indiquant qu'elles s'étaient bien intégrées aux tissus environnants. Nous n'avons pas observé de capsule fibreuse, et peu de tissus fibrotique a été révélé, indiquant une bonne tolérance des matrices par le système immunitaire de l'hôte. Après 3 mois d'implantation, le matériau semble disparaitre au profit d'une minéralisation plus importante. Après 6 mois, les matériaux implantés n'étaient plus visibles indiquant qu'ils avaient été dégradés.

Toutes les matrices ont été colonisées par des cellules ce qui s'est traduit notamment par la synthèse de tissu collagénique. Nous avons observé une corrélation entre la quantité de tissus ostéoïde formé et la concentration des matrices en HA. En revanche, la présence ou l'absence du peptide IKVAV/YIGSR n'influençaient pas la minéralisation des matrices.

Tous les hydrogels testés ont montré des propriétés pro-angiogéniques. La présence des structures vasculaires a été révélée par un marquage spécifique de l'endomucine. Après 7 jours d'implantation, les structures vasculaires sont essentiellement localisées en périphérie des matrices. Au quinzième jour, nous avons détecté des vaisseaux sanguins à l'intérieur des matrices, et le volume qu'ils occupent augmente jusqu'au 30ème jour. De plus, la surface occupée par ces vaisseaux dans les matrices contenant les particules d'HA est significativement plus grande que dans celles qui n'en contiennent pas. Ces résultats sont en adéquation avec ceux décrits dans la littérature qui montraient l'influence des particules d'HA sur la formation des vaisseaux sanguins (Nirwana *et al*. 2022).

En ce qui concerne l'innervation, les structures nerveuses ont toujours été observées en périphérie des implants, et la surface qu'elles occupent varient peu en fonction du temps d'implantation. Nous n'avons pas observé de réelle cinétique dans l'apparition des structures nerveuses telle que relatée par Li et ses collaborateurs (Li, Meyers, *et al*. 2019). Ils avaient montré une colonisation précoce par les nerfs sensitifs, suivie par les étapes de vascularisation puis de minéralisation. Les structures nerveuses jouent en effet un rôle important dans la réponse inflammatoire en transmettant des signaux de douleur, en modulant la circulation sanguine et la migration des cellules immunitaires, ce qui permet de réguler la réponse immunitaire dans la zone lésée.

Les matrices implantées en sous-cutané ne différaient que dans leur concentration en HA, ce qui nous a permis d'étudier l'effet de cette phase minérale. Une augmentation de la quantité de particules d'HA dans les hydrogels s'est traduite par une minéralisation accrue. En revanche nous n'avons pas observé d'effets significatifs sur les processus de vascularisation et d'innervation. D'autre part, nous avons montré que l'augmentation de la concentration en HA diminue la taille des pores des matrices. Nous pouvons donc conclure qu'une taille de pore d'environ 60 µm semble suffisante pour permettre l'invasion tissulaire et vasculaire *in vivo*.

Implantations des matrices en site osseux.

Pour évaluer l'efficacité de notre matériau dans la réparation osseuse, nous avons choisi dans un premier temps le modèle de la lésion dans le condyle fémoral de rat, suivi par des essais préliminaires réalisés dans la mandibule de rat.

Compte tenu des résultats acquis *in vitro* et *in vivo* en site sous-cutané, notre choix s'est orienté sur la formulation d'hydrogel contenant l'ELP, le peptide IKVAV/YIGSR, le peptide SNA15 et supplémentée par 2 % d'HA. En site ectopique, nous avions observé que les matrices composites à 1 % d'HA permettaient la vascularisation et la croissance des neurites. Cependant, nous avons sélectionné la formulation contenant 2 % d'HA car elle offrait la meilleure efficacité de minéralisation, ce qui est essentiel dans le cadre d'une thérapie de régénération osseuse.

Pour observer la minéralisation et la réparation de l'os nous avons réalisé un suivi longitudinal par la technique d'imagerie micro-CT. Cette technique non-invasive nous a permis de suivre la temporalité de la réparation du défaut osseux chez chaque individu, diminuant ainsi le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation. Néanmoins, ce suivi longitudinal a été contraignant en raison du temps nécessaire à l'acquisition des images. En effet, pour le bien-être des animaux, ils n'étaient pas laissés plus de 20 min sous anesthésie. Par ailleurs, les mouvements respiratoires des animaux ont parfois donné des acquisitions de moins bonne qualité, notamment dans le cas des défauts mandibulaires. Enfin, la résolution des images obtenues étant d'environ 42 µm, la délimitation du contour du défaut osseux était rendue de plus en plus difficile au fur et à mesure de la réparation du défaut. Ces contraintes techniques ont pu affecter la précision de certaines de nos mesures.

Les implantations dans les défauts condylaires ont montré qu'après deux mois, le condyle non comblé ne s'est pas refermé contrairement aux défauts comblés avec nos matrices composites ou avec le Collapat®. Par ailleurs, des fractures sont apparues chez les animaux pour lesquels les défauts n'avaient pas été comblés. Le pourcentage de minéralisation des défauts comblés avec notre matrice composite

etait de 56,0 ± 6,9 % après deux mois, et de 67,3 ± 6,3 % pour le Collapat®. À ce stade, nous n'avons pas observé de différence significative dans le niveau de minéralisation obtenu avec les deux types de biomatériau. Les coupes histologiques ont montré que notre matrice composite était bien intégrée dans le tissu environnant, les cellules ayant colonisé l'implant sans qu'une fibrose ne soit détectée. La quantification du tissu ostéoïde a montré qu'un maximum était atteint un mois après implantation pour les deux matrices ELP/peptides/HA et Collapat®. L'immunomarquage de l'ostéocalcine a également montré la présence de cellules ostéoblastiques. La quantification d'autres marqueurs des cellules osseuses comme Runx2, Ostérix et l'ostéopontine seront prochainement réalisés au laboratoire. Les protocoles correspondants sont en cours de développement par le Dr. Micaela ROQUE.

Les structures vasculaires ont été mises en évidence après la technique de transparisation des os et immunodétection de l'endomucine, de la podocalyxine et de la protéine MECA32. Nous avons observé la formation de structures vasculaires dans l'entièreté des défauts comblés avec nos matrices composites, alors qu'elles étaient détectées majoritairement en périphérie des défauts comblés par le Collapat®. Ce dernier point reste très encourageant et montre l'intérêt des matrices composites à base d'ELPs pour des applications en réparation osseuse. La quantification des réseaux vasculaires pourra être prochainement effectuée grâce à un nouveau logiciel de visualisation 3D (module Filament Tracer du logiciel Imaris®).

Enfin, nous développons actuellement un modèle de défaut osseux dans un os plat, la mandibule. Jusqu'à présent notre laboratoire utilisait plutôt le modèle de calvaria qui est plus facile à mettre en œuvre mais qui a pour inconvénient d'être peu soumis aux contraintes physiques, contraintes nécessaires à la réparation osseuse. Les premières expériences ont été réalisées à l'aide de nos matrices composites contenant 2 % d'HA.

De façon plus précise, les résultats préliminaires ont montré une néoformation de tissus osseux organisés, avec la présence de cellules osseuses, dont des ostéocytes, en périphérie et au centre de la lésion, ainsi que la présence de vaisseaux sanguins après 15 jours d'implantation. Ces travaux seront poursuivis afin de confirmer ces données.

Perspectives.

Le matériau composite à base d'ELPs, des peptides IKVAV/YIGSR et SNA15, et de particules d'HA a montré sa capacité à réparer un défaut osseux chez le petit animal. Après dépôt de notre brevet, nous avons obtenu un financement (projet de maturation) de la Société d'Accélération du Transfert de

Technologies (SATT) d'Aquitaine pour réaliser une étude chez le gros animal, avant d'évaluer le transfert de notre technologie vers un industriel du domaine.

Le modèle de cochon miniature « minipig » a été sélectionné car il est fréquemment utilisé pour les études précliniques des dispositifs médicaux, plus particulièrement dans le domaine de la chirurgie maxillo-faciale. Ces animaux, de petite taille, ont des caractéristiques morphologiques et physiologiques proches de celles de l'homme, notamment en ce qui concerne le squelette. La microstructure des os est en effet similaire à celle retrouvée chez l'humain (Mosekilde *et al*. 1987), et les processus de réparation osseuse sont semblables (Martínez-González *et al*. 2005). Par ailleurs la mastication, les mouvements de la mandibule et la taille des dents sont similaires dans les deux espèces. Nous avons choisi le modèle du comblement d'os alvéolaire, qui présente un marché intéressant en chirurgie maxillofaciale et implantologie. Ce site est soumis à des contraintes mécaniques compatibles avec les propriétés des matrices composites à base d'ELPs et d'HA. Le schéma expérimental est présenté ci-après.

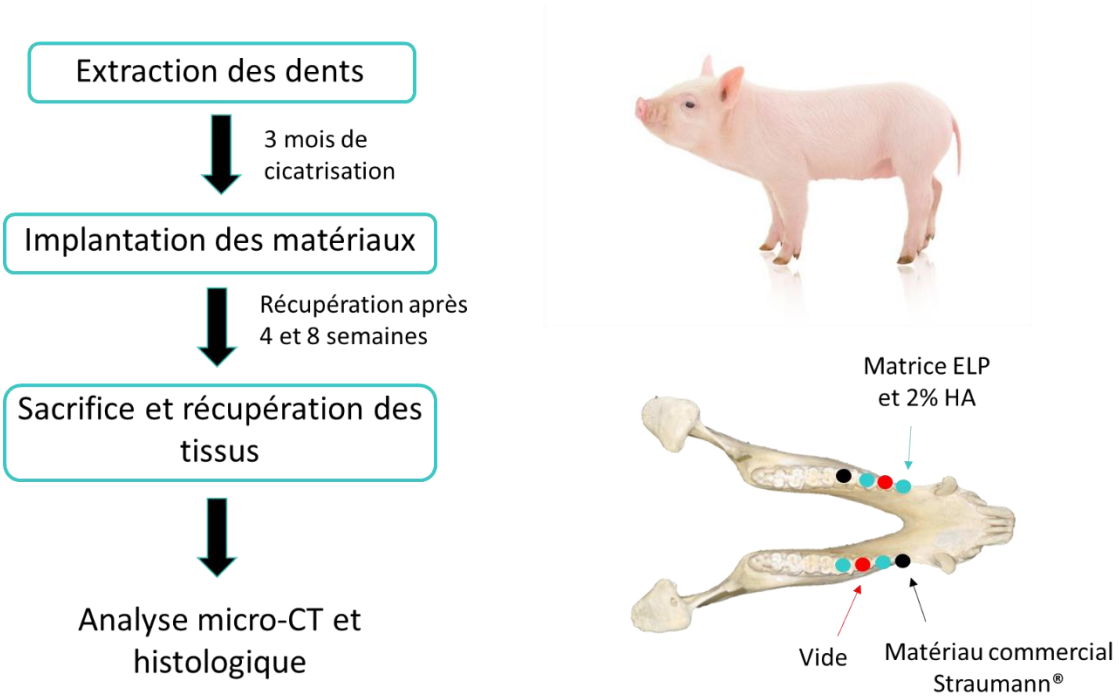


Schéma 2 : Présentation des principales étapes nécessaire à la création de défauts alvéolaires dans la mandibule chez le cochon « minipig ».

Cette étude sera réalisée avec 4 animaux, dont 2 seront sacrifiés après 30 jours d'implantation et les 2 autres après 2 mois. Pour cela, l'extraction dentaire de 8 dents par animal, comprenant des molaires et des prémolaires, a déjà été réalisée début janvier 2023 par la société Straumann®. Les principales étapes de cette expérimentation sont présentées dans le Schéma 2. Après l'extraction dentaire, une

première étape de cicatrisation sera nécessaire avant l'implantation des matrices composites qui est prévue pour avril 2023. Les actes de chirurgie seront réalisés par le Pr. Sylvain CATROS, Praticien Hospitalier en chirurgie orale et dentiste, qui a déjà réalisé l'ensemble des interventions présentées dans cette thèse.

Si les résultats obtenus chez le petit animal sont confirmés chez le cochon, cela ouvrira la voie aux études cliniques nécessaires pour une éventuelle mise sur le marché de cette nouvelle matrice composite.

Communications et publications

Communications avec actes dans un congrès national (ACTN)

- **Nadia Mahmoudi**, Bruno Paiva, Micaela Roque, Elisabeth Garanger, Sébastien Lecommandoux, Bertrand Garbay, Joëlle Amédée, « *Elastin derivative-based matrix for bone tissue engineering* » (Poster), 22èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), La Baule (France), Avril 2022.

Communications avec actes dans un congrès international (ACTI)

- **N. Mahmoudi**, B. Paiva dos Santos, H. Gautier, H. De Oliveira, E. Garanger, S.Lecommandoux, J. Amédée, B.Garbay, *« Formation of a versatile hydrogel based on chemoselectively modified Elastin-like polypeptides (ELPs) for tissue engineering applications* » (Poster), 31st conference of the European Society for Biomaterials, Porto (Portugal), Septembre 2021.

- **N. Mahmoudi**, M. Roque, B. Paiva dos Santos, H. De Oliveira, E. Garanger, S. Lecommandoux, B. Garbay, J. Amédée, « *A composite elastin derivative-based matrix for bone tissue engineering* » (Communication orale), 32nd Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Bordeaux (France), 8 Septembre 2022.

  N. Mahmoudi, B. Paiva dos Santos, H. De Oliveira, E. Garanger, S. Lecommandoux, B. Garbay, J. Amédée, « *Development of a matrix based on elastin-like polypeptides (ELP) to promote bone neoformation* » (Communication orale), Conférence internationale des matériaux, Colloque matériaux et santé, Lille (France), 27 octobre 2022.

Autres communications :

- **N. Mahmoudi**, B. Paiva dos Santos, H. Gautier, H. De Oliveira, E. Garanger, S. Lecommandoux, J. Amédée, B. Garbay, « *Development of a matrix based on elastin-like polypeptides (ELPs) to promote neurovascular network for bone Tissue Engineering* » (Poster), Journées Ecole Doctorale des Sciences Chimiques, Bordeaux (France), Mai 2021.

- **N. Mahmoudi**, M. Roque, B. Paiva, H. De Oliveira, E. Garanger, S. Lecommandoux, B. Garbay, J. Amédée, « *Development of a matrix based on elastin-like polypeptides (ELP) to promote bone*

neoformation.» (Communication orale), 4ème Journée Scientifique du département Sciences et Technologies pour la Santé (STS), Pessac (France), 24 Novembre 2022.

- Prix de la meilleure Flash Présentation.

Brevet N° FR1851770

- **N. Mahmoudi**, B. Paiva dos Santos, H. De Oliveira, E. Garanger, S. Lecommandoux, J. Amédée, B.Garbay « *Development of a functionalized Elastin like polypeptides combined with hydroxyapatite for promoting neurotization, osteogenesis and angiogenesis* ».

Bibliographie

Adams RH & Alitalo K (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 464–478.

Aderem AA (1988) Protein myristoylation as an intermediate step during signal transduction in macrophages: its role in arachidonic acid metabolism and in responses to interferon gamma. *J Cell Sci Suppl* 9, 151–167.

Akashi H & Gojobori T (2002) Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3695–3700.

Algharaibeh S, Wan H, Al-Fodeh R, Ireland AJ, Zhang D & Su B (2022) Fabrication and mechanical properties of biomimetic nacre-like ceramic/polymer composites for chairside CAD/CAM dental restorations. *Dent Mater* 38, 121–132.

Al-Jawoosh S, Ireland A & Su B (2018) Fabrication and characterisation of a novel biomimetic anisotropic ceramic/polymer-infiltrated composite material. *Dent Mater* 34, 994–1002.

Almigdad A, Mustafa A, Alazaydeh S, Alshawish M, Bani Mustafa M & Alfukaha H (2022) Bone Fracture Patterns and Distributions according to Trauma Energy. *Adv Orthop* 2022, 8695916.

Amini AA & Nair LS (2012) Enzymatically cross-linked injectable gelatin gel as osteoblast delivery vehicle. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 27, 342–355.

Amruthwar SS & Janorkar AV (2013) In vitro evaluation of elastin-like polypeptide–collagen composite scaffold for bone tissue engineering. *Dental Materials* 29, 211–220.

Anani T & Castillo AB (2022) Mechanically-regulated bone repair. *Bone* 154, 116223.

Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A & Dehghani F (2010) Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 371–383.

Antos JM & Francis MB (2004) Selective tryptophan modification with rhodium carbenoids in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 126, 10256–10257.

Aoki H, Kato K, Ebihara M & Inoue M (1976) [Studies on the application of apatite to dental materials. (I) --Apatite ceramics-- (author's transl)]. *Shika Rikogaku Zasshi* 17, 200–205.

Appelt J, Baranowsky A, Jahn D, Yorgan T, Köhli P, Otto E, Farahani SK, Graef F, Fuchs M, Herrera A, Amling M, Schinke T, Frosch K-H, Duda GN, Tsitsilonis S & Keller J (2020) The neuropeptide calcitonin gene-related peptide alpha is essential for bone healing. *eBioMedicine* 59, 102970.

Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Galed G & Heras A Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology* 3, 203–230.

Artal-Mittelmark R (2021) Physiologie de la grossesse - Gynécologie et obstétrique. *Édition professionnelle du Manuel MSD*. Available at: https://www.msdmanuals.com/fr/professional/gyn%C3%A9cologie-et-obst%C3%A9trique/prise-en-charge-de-la-femme-enceinte-et-suivi-de-la-grossesse/physiologie-de-la-grossesse?query=taille%20de%20l'ut%C3%A9rus [Accessed January 27, 2023].

Arvidson K & Wróblewski R (1978) Migration of metallic ions from screwposts into dentin and surrounding tissues. *Scand J Dent Res* 86, 200–205.

Asada K, Obata K, Horiguchi K & Takaki M (2012) Age-related changes in afferent responses in sensory neurons to mechanical stimulation of osteoblasts in coculture system. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C757-765.

Autissier A, Visage CL, Pouzet C, Chaubet F & Letourneur D (2010) Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomaterialia* 6, 3640–3648.

Babilotte J (2021) Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science*, 13.

Babilotte J, Guduric V, Le Nihouannen D, Naveau A, Fricain J-C & Catros S (2019) 3D printed polymer-mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 107, 2579–2595.

Babilotte J, Martin B, Guduric V, Bareille R, Agniel R, Roques S, Héroguez V, Dussauze M, Gaudon M, Le Nihouannen D & Catros S (2021) Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 118, 111334.

Bahrami A, Simon U, Soltani N, Zavareh S, Schmidt J, Pech-Canul MI & Gurlo A (2017) Eco-fabrication of hierarchical porous silica monoliths by ice-templating of rice husk ash. *Green Chem.* 19, 188–195.

Bai H, Chen Y, Delattre B, Tomsia AP & Ritchie RO (2015) Bioinspired large-scale aligned porous materials assembled with dual temperature gradients. *Sci Adv* 1, e1500849.

Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, Benvenuti MA, Cole HA, Egawa S, Okawa A, Saito M, McCarthy JR, Nyman JS, Yuasa M & Schoenecker JG (2018) Bone Fracture Acute Phase Response—A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. *Clinic Rev Bone Miner Metab* 16, 142–158.

Belaud V, Petithory T, Ponche A, Mauclair C, Donnet C, Pieuchot L, Benayoun S & Anselme K (2018) Influence of multiscale and curved structures on the migration of stem cells. *Biointerphases* 13, 06D408.

Belle M, Godefroy D, Couly G, Malone SA, Collier F, Giacobini P & Chédotal A (2017) Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell* 169, 161-173.e12.

Benhamza (2019) Squelette appendiculaire. *La bio dans tous ses états*. Available at: https://biobenhamza.home.blog/tag/squelette-appendiculaire/ [Accessed January 27, 2023].

Benhamza (2020) Vaisseaux sanguins – La bio dans tous ses états. Available at: https://biobenhamza.home.blog/2020/05/02/vaisseaux-sanguins/ [Accessed November 8, 2022].

Bennick A (1982) Salivary proline-rich proteins. *Mol Cell Biochem* 45. Available at: http://link.springer.com/10.1007/BF00223503 [Accessed September 19, 2022].

Ben-Porat T, Kaplan AS, Stehn B & Rubenstein AS (1976) Concatemeric forms of intracellular herpesvirus DNA. *Virology* 69, 547–560.

Beşkardeş IG, Demirtaş TT, Durukan MD & Gümüşderelioğlu M (2015) Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9, 1233–1246.

Betre H, Setton LA, Meyer DE & Chilkoti A (2002) Characterization of a Genetically Engineered Elastin-like Polypeptide for Cartilaginous Tissue Repair. *Biomacromolecules* 3, 910–916.

Bigerelle M, Giljean S & Anselme K (2011) Existence of a typical threshold in the response of human mesenchymal stem cells to a peak and valley topography. *Acta Biomater* 7, 3302–3311.

Bizzozero OA & Lees MB (1986) Fatty acid acylation of rat brain myelin proteolipid protein in vitro: identification of the lipid donor. *J Neurochem* 46, 630–636.

Boston University (2002) HLS [Cartilage and Bone and Bone Histogenesis, compact bone] LOW MAG labeled. Available at: https://www.bu.edu/phpbin/medlib/histology/p/02701loa.htm [Accessed November 3, 2022].

Bouler JM, LeGeros RZ & Daculsi G (2000) Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio. *J Biomed Mater Res* 51, 680–684.

Br Med J (1955) BONE CHANGES caused by nerve lesions. *Br Med J* 1, 1466–1467.

Branch DW, Wheeler BC, Brewer GJ & Leckband DE (2001) Long-term stability of grafted polyethylene glycol surfaces for use with microstamped substrates in neuronal cell culture. *Biomaterials* 22, 1035–1047.

Brazill JM, Beeve AT, Craft CS, Ivanusic JJ & Scheller EL (2019) Nerves in Bone: Evolving Concepts in Pain and Anabolism. *Journal of Bone and Mineral Research* 34, 1393–1406.

Brinker M & O'connor DP (2007) Type of Fracture Healing Based on Type of Stabilization. Available at: https://www.semanticscholar.org/paper/Type-of-Fracture-Healing-Based-on-Type-of-Brinker-O%27connor/6d9338f6c7ec45062a9a7a4abf833872c33edc7f/figure/19 [Accessed December 12, 2022].

Brown PL, Mecham L, Tisdale C & Mecham RP (1992) The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that stabilizes a loop structure and positively charged pocket. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186, 549–555.

Brown TE, Carberry BJ, Worrell BT, Dudaryeva OY, McBride MK, Bowman CN & Anseth KS (2018) Photopolymerized dynamic hydrogels with tunable viscoelastic properties through thioester exchange. *Biomaterials* 178, 496–503.

Buck DW & Dumanian GA (2012) Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 129, 1314–1320.

Buckwalter JA & Mankin HJ (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 47, 477–486.

Camasão DB, González-Pérez M, Palladino S, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC & Mantovani D (2020) Elastin-like recombinamers in collagen-based tubular gels improve cell-mediated remodeling and viscoelastic properties. *Biomater. Sci.* 8, 3536–3548.

Cao J, Zhang S, Gupta A, Du Z, Lei D, Wang L & Wang X (2019) Sensory Nerves Affect Bone Regeneration in Rabbit Mandibular Distraction Osteogenesis. *Int J Med Sci* 16, 831–837.

Carlborg CF, Haraldsson T, Öberg K, Malkoch M & Wijngaart W van der (2011) Beyond PDMS: off-stoichiometry thiol–ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices. *Lab Chip* 11, 3136–3147.

Carragee EJ, Chu G, Rohatgi R, Hurwitz EL, Weiner BK, Yoon ST, Comer G & Kopjar B (2013) Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am* 95, 1537–1545.

Caves JM, Kumar VA, Martinez AW, Kim J, Ripberger CM, Haller CA & Chaikof EL (2010) The use of microfiber composites of elastin-like protein matrix reinforced with synthetic collagen in the design of vascular grafts. *Biomaterials* 31, 7175–7182.

Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W & Cao Y (2008) Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res* 63, 492–496.

Chalker JM, Bernardes GJL, Lin YA & Davis BG (2009) Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *Chem Asian J* 4, 630–640.

Chantrain C & DeClerck YA (2002) Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)* 18, 565–575.

Charbord P & Casteilla L (2011) La biologie des cellules souchesmésenchymateuses d'origine humaine. *Med Sci (Paris)* 27, 261–267.

Chartier SR, Thompson ML, Longo G, Fealk MN, Majuta LA & Mantyh PW (2014) Exuberant sprouting of sensory and sympathetic nerve fibers in nonhealed bone fractures and the generation and maintenance of chronic skeletal pain. *Pain* 155, 2323–2336.

Chau Y, Luo Y, Cheung ACY, Nagai Y, Zhang S, Kobler JB, Zeitels SM & Langer R (2008) Incorporation of a matrix metalloproteinase-sensitive substrate into self-assembling peptides – A model for biofunctional scaffolds. *Biomaterials* 29, 1713–1719.

Chau Y, Tan FE & Langer R (2004) Synthesis and Characterization of Dextran−Peptide−Methotrexate Conjugates for Tumor Targeting via Mediation by Matrix Metalloproteinase II and Matrix Metalloproteinase IX. *Bioconjugate Chem.* 15, 931–941.

Chavda HV & Patel CN (2011) Effect of crosslinker concentration on characteristics of superporous hydrogel. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 1, 17.

Chen W, Mao C, Zhuo L & Ong JL (2015) Beta-nerve growth factor promotes neurogenesis and angiogenesis during the repair of bone defects. *Neural Regeneration Research* 10, 1159.

Chen Z, Zhang Q, Li H, Wei Q, Zhao X & Chen F (2021) Elastin-like polypeptide modified silk fibroin porous scaffold promotes osteochondral repair. *Bioactive Materials* 6, 589–601.

Chenu C (2001) Innervation de l'os. *Med Sci (Paris)* 17, 1276–1280.

Chiu IM, von Hehn CA & Woolf CJ (2012) Neurogenic Inflammation – The Peripheral Nervous System's Role in Host Defense and Immunopathology. *Nat Neurosci* 15, 1063–1067.

Chow DC, Dreher MR, Trabbic-Carlson K & Chilkoti A (2006) Ultra-high expression of a thermally responsive recombinant fusion protein in E. coli. *Biotechnol. Prog.* 22, 638–646.

Chu H-S, Lee K-H, Park J-E, Kim D-M, Kim B-G & Won J-I (2010) Expression analysis of an elastin-like polypeptide (ELP) in a cell-free protein synthesis system. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 87–91.

Cipriani F, Ariño Palao B, Gonzalez de Torre I, Vega Castrillo A, Aguado Hernández HJ, Alonso Rodrigo M, Àlvarez Barcia AJ, Sanchez A, García Diaz V, Lopez Peña M & Rodriguez-Cabello JC (2019) An elastin-like recombinamer-based bioactive hydrogel embedded with mesenchymal stromal cells as an injectable scaffold for osteochondral repair. *Regen Biomater* 6, 335–347.

Coletta DJ, Ibáñez-Fonseca A, Missana LR, Jammal MV, Vitelli EJ, Aimone M, Zabalza F, Issa JPM, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC & Feldman S (2017) Bone Regeneration Mediated by a Bioactive and Biodegradable Extracellular Matrix-Like Hydrogel Based on Elastin-Like Recombinamers. *Tissue Engineering Part A* 23, 1361–1371.

Comb DG, Sarkar N & Pinzino CJ (1966) The methylation of lysine residues in protein. *J Biol Chem* 241, 1857–1862.

Cowin SC & Cardoso L (2015) Blood and interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue. *J Biomech* 48, 842–854.

Dai M, Belaïdi J-P, Fleury G, Garanger E, Rielland M, Schultze X & Lecommandoux S (2021) Elastin-like Polypeptide-Based Bioink: A Promising Alternative for 3D Bioprinting. *Biomacromolecules* 22, 4956–4966.

Dai M, Georgilis E, Goudounet G, Garbay B, Pille J, van Hest JCM, Schultze X, Garanger E & Lecommandoux S (2021) Refining the Design of Diblock Elastin-Like Polypeptides for Self-Assembly into Nanoparticles. *Polymers (Basel)* 13, 1470.

Daniel G. Schultz (2008) FDA issues notification about recombinant bone morphogenetic proteins used in spinal fusion. Available at: https://www.healio.com/news/orthopedics/20120331/fda-issues-notification-about-recombinant-bone-morphogenetic-proteins-used-in-spinal-fusion [Accessed November 30, 2022].

Daskalova M, Taskov H, Dimitrova E & Baydanoff S (1997) Humoral and cellular immune response to elastin in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 25, 233–241.

De Colli M, Massimi M, Barbetta A, Di Rosario BL, Nardecchia S, Conti Devirgiliis L & Dentini M (2012) A biomimetic porous hydrogel of gelatin and glycosaminoglycans cross-linked with transglutaminase and its application in the culture of hepatocytes. *Biomed Mater* 7, 055005.

Delgado LM, Pandit A & Zeugolis DI (2014) Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties. *Expert Review of Medical Devices* 11, 305–314.

Deming TJ (2017) Functional Modification of Thioether Groups in Peptides, Polypeptides, and Proteins. *Bioconjugate Chem.* 28, 691–700.

Dhawan U, Jaffery H, Salmeron-Sanchez M & Dalby MJ (2022) An ossifying landscape: materials and growth factor strategies for osteogenic signalling and bone regeneration. *Current Opinion in Biotechnology* 73, 355–363.

Dos Santos BP, Garbay B, Fenelon M, Rosselin M, Garanger E, Lecommandoux S, Oliveira H & Amédée J (2019) Development of a cell-free and growth factor-free hydrogel capable of inducing angiogenesis and innervation after subcutaneous implantation. *Acta Biomater* 99, 154–167.

Dreher MR, Simnick AJ, Fischer K, Smith RJ, Patel A, Schmidt M & Chilkoti A (2008) Temperature triggered self-assembly of polypeptides into multivalent spherical micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 687–694.

Ducy P, Schinke T & Karsenty G (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289, 1501–1504.

Edoff K, Hellman J, Persliden J & Hildebrand C (1997) The developmental skeletal growth in the rat foot is reduced after denervation. *Anat Embryol* 195, 531–538.

Ehret C, Aid-Launais R, Sagardoy T, Siadous R, Bareille R, Rey S, Pechev S, Etienne L, Kalisky J, de Mones E, Letourneur D & Amedee Vilamitjana J (2017) Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation. *PLoS One* 12, e0184663.

Ernenwein D (2012) Greffe osseuse, Site de prélèvement | Implant dentaire et greffes osseuses pré-implantaires. Available at: http://www.implants-dentaires.eu/les-differentes-zones-donneuses/106/, http://www.implants-dentaires.eu/les-differentes-zones-donneuses/106/ [Accessed November 17, 2022].

Esteghamat F, Broughton JS, Smith E, Cardone R, Tyagi T, Guerra M, Szabó A, Ugwu N, Mani MV, Azari B, Kayingo G, Chung S, Fathzadeh M, Weiss E, Bender J, Mane S, Lifton RP, Adeniran A, Nathanson MH, Gorelick FS, Hwa J, Sahin-Tóth M, Belfort-DeAguiar R, Kibbey RG & Mani A (2019) CELA2A mutations predispose to early-onset atherosclerosis and metabolic syndrome and affect plasma insulin and platelet activation. *Nat Genet* 51, 1233–1243.

Fang K, Song W, Wang L, Jia S, Wei H, Ren S, Xu X & Song Y (2014) Immobilization of chitosan film containing semaphorin 3A onto a microarc oxidized titanium implant surface via silane reaction to improve MG63 osteogenic differentiation. *Int J Nanomedicine* 9, 4649–4657.

Farr JN & Khosla S (2019) Cellular senescence in bone. *Bone* 121, 121–133.

Ferla MP & Patrick WM (2014) Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology (Reading)* 160, 1571–1584.

Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset A-M, Benkirane-Jessel N, Bornert F & Offner D (2018) Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng* 9, 2041731418776819.

Fiala S (1947) About the Oxidation and Denaturing effects of UV rays on Protein Bodies. *Biochem Z* 318, 67–73.

Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ & Cerri PS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015, 421746.

Fonseca KB, Gomes DB, Lee K, Santos SG, Sousa A, Silva EA, Mooney DJ, Granja PL & Barrias CC (2014) Injectable MMP-sensitive alginate hydrogels as hMSC delivery systems. *Biomacromolecules* 15, 380–390.

Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, Catros S, Lalande C, Bareille R, Renard M, Fabre T, Cornet S, Durand M, Léonard A, Sahraoui N, Letourneur D & Amédée J (2013) A nano-hydroxyapatite – Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* 34, 2947–2959.

Fu R, Selph S, McDonagh M, Peterson K, Tiwari A, Chou R & Helfand M (2013) Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 158, 890–902.

Gaihre B, Liu X, Li L, Lee Miller Ii A, Camilleri ET, Li Y, Waletzki B & Lu L (2021) Bifunctional hydrogel for potential vascularized bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 124, 112075.

García JR, Clark AY & García AJ (2016) Integrin-specific hydrogels functionalized with VEGF for vascularization and bone regeneration of critical-size bone defects. *J Biomed Mater Res A* 104, 889–900.

Garland D & Adkins R (2001) Bone Loss at the Knee in Spinal Cord Injury. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation* 6, 37–46.

George EM, Mahdi F, Logue OC, Robinson GG & Bidwell GL (2016) Corneal Penetrating Elastin-Like Polypeptide Carriers. *J Ocul Pharmacol Ther* 32, 163–171.

Gerecht S, Townsend SA, Pressler H, Zhu H, Nijst CLE, Bruggeman JP, Nichol JW & Langer R (2007) A porous photocurable elastomer for cell encapsulation and culture. *Biomaterials* 28, 4826–4835.

Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA & Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343–345.

Gong JK, Arnold JS & Cohn SH (1964) COMPOSITION OF TRABECULAR AND CORTICAL BONE. *Anat Rec* 149, 325–331.

González M, Salvagni E, Rodríguez-Cabello JC, Rupérez E, Gil FJ, Peña J & Manero JM (2013) A low elastic modulus Ti-Nb-Hf alloy bioactivated with an elastin-like protein-based polymer enhances osteoblast cell adhesion and spreading. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101A, 819–826.

González-Pérez M, Camasão DB, Mantovani D, Alonso M & Rodríguez-Cabello JC (2021) Biocasting of an elastin-like recombinamer and collagen bi-layered model of the tunica adventitia and external elastic lamina of the vascular wall. *Biomater. Sci.* 9, 3860–3874.

Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, Rotherham M, El Haj A, Shakesheff KM & Oreffo ROC (2014) Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 28, 166–207; discussion 207-208.

Grässel S (2014) The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res Ther* 16, 485.

Grebner EE, Hall CW & Neufeld EF (1966) Glycosylation of serine residues by a uridine diphosphate-xylose: protein xylosyltransferase from mouse mastocytoma. *Arch Biochem Biophys* 116, 391–398.

Griffin BE & Reese CB (1964) SOME OBSERVATIONS ON THE MECHANISM OF THE ACYLATION PROCESS IN PROTEIN SYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 440–444.

Grosso A, Burger MG, Lunger A, Schaefer DJ, Banfi A & Di Maggio N (2017) It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 5. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2017.00068 [Accessed November 30, 2022].

Grüneboom A, Hawwari I, Weidner D, Culemann S, Müller S, Henneberg S, Brenzel A, Merz S, Bornemann L, Zec K, Wuelling M, Kling L, Hasenberg M, Voortmann S, Lang S, Baum W, Ohs A, Kraff O, Quick H & Gunzer M (2019) A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nature Metabolism* 1.

Gu B-H, Choi JC, Shen YH, Song L-Z, Scheurer ME, Luong A, Rodriguez A, Woodruff P, Koth L, Corry DB, Kheradmand F & LeMaire SA (2019) Elastin-Specific Autoimmunity in Smokers With Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection is Independent of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Am Heart Assoc* 8, e011671.

Gurumurthy B, Bierdeman PC & Janorkar AV (2016) Composition of elastin like polypeptide–collagen composite scaffold influences in vitro osteogenic activity of human adipose derived stem cells. *Dental Materials* 32, 1270–1280.

Gurumurthy B, Tucci MA, Fan L-W, Benghuzzi HA, Pal P, Bidwell GL, Salazar Marocho SM, Cason Z, Gordy D & Janorkar AV (2020) Collagen-Elastin-Like Polypeptide-Bioglass Scaffolds for Guided Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater* 9, e1901385.

Hadjidakis DJ & Androulakis II (2006) Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092, 385–396.

Hankermeyer CR, Ohashi KL, Delaney DC, Ross J & Constantz BR (2002) Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid. *Biomaterials* 23, 743–750.

Hardy R & Cooper MS (2009) Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol* 201, 309–320.

Hasani-Sadrabadi MM, Sarrion P, Pouraghaei S, Chau Y, Ansari S, Li S, Aghaloo T & Moshaverinia A (2020) An engineered cell-laden adhesive hydrogel promotes craniofacial bone tissue regeneration in rats. *Sci Transl Med* 12, eaay6853.

Hassouneh W, Christensen T & Chilkoti A (2010) Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 6, Unit 6.11.

Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A & Takayanagi H (2012) Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* 485, 69–74.

Hein CD, Liu X-M & Wang D (2008) Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm Res* 25, 2216–2230.

Helmrich U, Di Maggio N, Güven S, Groppa E, Melly L, Largo RD, Heberer M, Martin I, Scherberich A & Banfi A (2013) Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF-expressing human mesenchymal progenitors. *Biomaterials* 34, 5025–5035.

Hemonnot-Girard A-L, Haim LB, Escartin C & Hirbec H (2021) De nouvelles techniques pour dévoiler le rôle des cellules gliales du cerveau. *Med Sci (Paris)* 37, 59–67.

Hersel U, Dahmen C & Kessler H (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24, 4385–4415.

Herzog RW, Singh NK, Urry DW & Daniell H (1997) Expression of a synthetic protein-based polymer (elastomer) gene in Aspergillus nidulans. *Appl Microbiol Biotechnol* 47, 368–372.

Hofsteenge J, Müller DR, de Beer T, Löffler A, Richter WJ & Vliegenthart JF (1994) New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* 33, 13524–13530.

Horii A, Wang X, Gelain F & Zhang S (2007) Biological Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds Significantly Enhance Osteoblast Proliferation, Differentiation and 3-D Migration. *PLoS One* 2, e190.

Hu J, Hou Y, Park H, Choi B, Hou S, Chung A & Lee M (2012) Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomater* 8, 1730–1738.

Hughes JM (1996) Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates By J. C. Elliot (The London Hospital Medical College). Elsevier: Amsterdam. 1994. xii + 389 pp. ISBN 0-444-81582-1. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 3072–3072.

Ibrahimova V, Zhao H, Ibarboure E, Garanger E & Lecommandoux S (2021) Thermosensitive Vesicles from Chemically Encoded Lipid-Grafted Elastin-like Polypeptides. *Angew Chem Int Ed Engl* 60, 15036–15040.

James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, Ting K & Soo C (2016) A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev* 22, 284–297.

Jang H, Nguyen M-C, Noh S, Cho WK, Sohn Y, Yee K, Jung H & Kim J (2022) UV laser sterilization of Bacillus atrophaeus spores on ceramic tiles. *Ceramics International* 48, 1446–1450.

Ji Y, Ghosh K, Li B, Sokolov JC, Clark RAF & Rafailovich MH (2006) Dual-Syringe Reactive Electrospinning of Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience* 6, 811–817.

Jilka RL (2003) Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Medical and Pediatric Oncology* 41, 182–185.

Jing D, Yi Y, Luo W, Zhang S, Yuan Q, Wang J, Lachika E, Zhao Z & Zhao H (2019) Tissue Clearing and Its Application to Bone and Dental Tissues. *J Dent Res* 98, 621–631.

Johnson T & Koria P (2016) Expression and Purification of Neurotrophin-Elastin-Like Peptide Fusion Proteins for Neural Regeneration. *BioDrugs* 30, 117–127.

Johnsson M, Richardson CF, Bergey EJ, Levine MJ & Nancollas GH (1991) The effects of human salivary cystatins and statherin on hydroxyapatite crystallization. *Archives of Oral Biology* 36, 631–636.

K. MacCallum D (1990) Bone and Bone Formation | histology. Available at: https://histology.medicine.umich.edu/resources/bone-bone-formation [Accessed October 19, 2022].

Kaastrup K & Grønbæk K (2021) The Impact of Sedentary Lifestyle, High-fat Diet, Tobacco Smoke, and Alcohol Intake on the Hematopoietic Stem Cell Niches. *Hemasphere* 5, e615.

Kämäräinen T, Kadota K, Tse JY, Uchiyama H, Yamanaka S & Tozuka Y (2022) Modulating the Pore Architecture of Ice-Templated Dextran Microparticles Using Molecular Weight and Concentration. *Langmuir* 38, 6741–6751.

Kanemoto T, Reich R, Royce L, Greatorex D, Adler SH, Shiraishi N, Martin GR, Yamada Y & Kleinman HK (1990) Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2279–2283.

Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, Vynios DH, Orian-Rousseau V, Ricard-Blum S, Schmelzer CEH, Duca L, Durbeej M, Afratis NA, Troeberg L, Franchi M, Masola V & Onisto M (2021) A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS Journal* 288, 6850–6912.

Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E & Matsumoto T (1994) Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 135, 774–781.

Keating JF, Simpson AHRW & Robinson CM (2005) The management of fractures with bone loss. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* 87-B, 142–150.

Keeley FW (1979) The synthesis of soluble and insoluble elastin in chicken aorta as a function of development and age. Effect of a high cholesterol diet. *Can J Biochem* 57, 1273–1280.

Khosla S, Oursler MJ & Monroe DG (2012) Estrogen and the Skeleton. *Trends Endocrinol Metab* 23, 576–581.

Kim J-W, Lee J-B, Koh Y-H & Kim H-E (2019) Digital Light Processing of Freeze-cast Ceramic Layers for Macroporous Calcium Phosphate Scaffolds with Tailored Microporous Frameworks. *Materials (Basel)* 12, 2893.

Kirst C, Skriabine S, Vieites-Prado A, Topilko T, Bertin P, Gerschenfeld G, Verny F, Topilko P, Michalski N, Tessier-Lavigne M & Renier N (2020) Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature. *Cell* 180, 780-795.e25.

Koch D, Rosoff WJ, Jiang J, Geller HM & Urbach JS (2012) Strength in the Periphery: Growth Cone Biomechanics and Substrate Rigidity Response in Peripheral and Central Nervous System Neurons. *Biophys J* 102, 452–460.

Koland M, Narayanan Vadakkepushpakath A, John A, Tharamelveliyil Rajendran A & Raghunath I (2022) Thermosensitive In Situ Gels for Joint Disorders: Pharmaceutical Considerations in Intra-Articular Delivery. *Gels* 8, 723.

Kramer JR, Petitdemange R, Bataille L, Bathany K, Wirotius A-L, Garbay B, Deming TJ, Garanger E & Lecommandoux S (2015) Quantitative Side-Chain Modifications of Methionine-Containing Elastin-Like Polypeptides as a Versatile Tool to Tune Their Properties. *ACS Macro Lett.* 4, 1283–1286.

Kristensen JH & Karsdal MA (2016) Chapter 30 - Elastin. In M. A. Karsdal, ed. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*. Academic Press, pp.197–201. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098479000301 [Accessed October 20, 2022].

Krylova E, Ivanov A, Orlovski V, El-Registan G & Barinov S (2002) Hydroxypatite-polysaccharide granules for drug delivery. *J Mater Sci Mater Med* 13, 87–90.

Kuhn LT, Peng T, Gronowicz G & Hurley MM (2021) Endogenous FGF-2 levels impact FGF-2/BMP-2 growth factor delivery dosing in aged murine calvarial bone defects. *J Biomed Mater Res A* 109, 2545–2555.

Kumada Y, Hammond N & Zhang S (2010) Functionalized scaffolds of shorter self-assembling peptides containing MMP-2 cleavable motif promote fibroblast proliferation and significantly accelerate 3-D cell migration independent of scaffold stiffness. *Soft Matter* 6, 5073–5079.

Kundu PK, Waghode TS, Bahadur D & Datta D (1998) Cell culture approach to biocompatibility evaluation of unconventionally prepared hydroxyapatite. *Med Biol Eng Comput* 36, 654–658.

Kusumbe AP, Ramasamy SK & Adams RH (2014) Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 507, 323–328.

Lakhkar NJ, Lee I-H, Kim H-W, Salih V, Wall IB & Knowles JC (2013) Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 405–420.

Lam RHW & Chen W (2019) Polymers. In R. H. W. Lam & W. Chen, eds. *Biomedical Devices: Materials, Design, and Manufacturing*. Cham: Springer International Publishing, pp.89–116. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-24237-4_4 [Accessed September 20, 2022].

Lawrence RA & Haggerty RJ (1971) Household agents and their potential toxicity. *Mod Treat* 8, 511–527.

Lecturio (2023) Overview of Bone Fractures - Lecturio. Available at: https://app.lecturio.com/#/article/3262?return=%23%2Fwelcome%3Ffv%3D1 [Accessed December 14, 2022].

Lee J, Macosko CW & Urry DW (2001) Elastomeric polypentapeptides cross-linked into matrixes and fibers. *Biomacromolecules* 2, 170–179.

Lee JW, Kim H & Lee KY (2016) Effect of spacer arm length between adhesion ligand and alginate hydrogel on stem cell differentiation. *Carbohydrate Polymers* 139, 82–89.

Lee KY & Mooney DJ (2001) Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101, 1869–1879.

Lee M, Ahn JI, Ahn JY, Yang WS, Hubbell JA, Lim JM & Lee ST (2017) Difference in suitable mechanical properties of three-dimensional, synthetic scaffolds for self-renewing mouse embryonic stem cells of different genetic backgrounds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 105, 2261–2268.

Lee S, Kim J-E, Seo H-J & Jang J-H (2019) Design of fibronectin type III domains fused to an elastin-like polypeptide for the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ABBS* 51, 856–863.

Lefevre M & Rucker RB (1980) Aorta elastin turnover in normal and hypercholesterolemic Japanese quail. *Biochim Biophys Acta* 630, 519–529.

LeGeros RZ (2008) Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chem. Rev.* 108, 4742–4753.

Leroux A, Paiva dos Santos B, Leng J, Oliveira H & Amédée J (2020) Sensory neurons from dorsal root ganglia regulate endothelial cell function in extracellular matrix remodelling. *Cell Commun Signal* 18, 162.

Levêque M, Xiao Y, Durand L, Massé L, Garanger E & Lecommandoux S (2022a) Aqueous synthesis and self-assembly of bioactive and thermo-responsive HA- *b* -ELP bioconjugates. *Biomater. Sci.*, 10.1039.D2BM01149B.

Levêque M, Xiao Y, Durand L, Massé L, Garanger E & Lecommandoux S (2022b) Aqueous synthesis and self-assembly of bioactive and thermo-responsive HA-b-ELP bioconjugates. *Biomater. Sci.* Available at: https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/bm/d2bm01149b [Accessed October 17, 2022].

Li B, Qiu T, Zhang P, Wang X, Yin Y & Li S (2014) IKVAV regulates ERK1/2 and Akt signalling pathways in BMMSC population growth and proliferation. *Cell Proliferation* 47, 133–145.

Li J, Ahmad T, Spetea M, Ahmed M & Kreicbergs A (2001) Bone Reinnervation After Fracture: A Study in the Rat. *Journal of Bone and Mineral Research* 16, 1505–1510.

Li J, Kacena MA & Stocum DL (2019) Chapter 12 - Fracture Healing. In D. B. Burr & M. R. Allen, eds. *Basic and Applied Bone Biology (Second Edition)*. Academic Press, pp.235–253. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132593000129 [Accessed November 15, 2022].

Li Y, Rodriguez-Cabello JC & Aparicio C (2017) Intrafibrillar Mineralization of Self-Assembled Elastin-Like Recombinamer Fibrils. *ACS Appl Mater Interfaces* 9, 5838–5846.

Li Z, Meyers CA, Chang L, Lee S, Li Z, Tomlinson R, Hoke A, Clemens TL & James AW (2019) Fracture repair requires TrkA signaling by skeletal sensory nerves. *J Clin Invest* 129, 5137–5150.

Li Z, Ren Q, Han S, Ding L, Qin X, Hu D, He T, Tian T, Lu Z & Zhang L (2022) Promoting effect of a calcium-responsive self-assembly β-sheet peptide on collagen intrafibrillar mineralization. *Regen Biomater* 9, rbac059.

Li ZC, Qin X, Ren Q, Hu D, Tian T, He T, Li W & Zhang LL (2020) Rational Design of β-sheet Peptides with Self-Assembly into Nanofibres on Remineralisation of Initial Caries Lesions. *Chin J Dent Res* 23, 131–141.

Lin S, Yang X, Jia S, Weeks AM, Hornsby M, Lee PS, Nichiporuk RV, Iavarone AT, Wells JA, Toste FD & Chang CJ (2017) Redox-based reagents for chemoselective methionine bioconjugation. *Science* 355, 597–602.

Liu M, Li M-D, Xue J & Phillips DL (2014) Time-Resolved Spectroscopic and Density Functional Theory Study of the Photochemistry of Irgacure-2959 in an Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. A* 118, 8701–8707.

Liu Q, Rauth AM & Wu XY (2007) Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelation-adsorption-polyelectrolyte coating method. *Int J Pharm* 339, 148–156.

Liu T, Gao Y, Sakamoto K, Minamizato T, Furukawa K, Tsukazaki T, Shibata Y, Bessho K, Komori T & Yamaguchi A (2007) BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines. *J Cell Physiol* 211, 728–735.

Liu W, MacKay JA, Dreher MR, Chen M, McDaniel JR, Simnick AJ, Callahan DJ, Zalutsky MR & Chilkoti A (2010) Injectable intratumoral depot of thermally responsive polypeptide–radionuclide conjugates delays tumor progression in a mouse model. *Journal of Controlled Release* 144, 2–9.

Lm (2016) Available at: https://fineartamerica.com/featured/bone-cross-section-lm-science-stock-photography.html.

Lopez MJ & Mohiuddin SS (2022) Biochemistry, Essential Amino Acids. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/ [Accessed October 21, 2022].

Luo M, Gao Y, Yang S, Quan X, Sun D, Liang K, Li J & Zhou J (2019) Computer simulations of the adsorption of an N-terminal peptide of statherin, SN15, and its mutants on hydroxyapatite surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21, 9342–9351.

Lynn AK, Yannas IV & Bonfield W (2004) Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 71, 343–354.

Ma J, Liang CH, Kong LB & Wang C (2003) Colloidal characterization and electrophoretic deposition of hydroxyapatite on titanium substrate. *J Mater Sci Mater Med* 14, 797–801.

Ma M-G, Zhu Y-J & Chang J (2006) Monetite formed in mixed solvents of water and ethylene glycol and its transformation to hydroxyapatite. *J Phys Chem B* 110, 14226–14230.

Macron J (2014) *Hydrogels in aqueous media : from macroscopic adhesion to molecular mechanisms*. phdthesis. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. Available at: https://theses.hal.science/tel-01102383 [Accessed January 27, 2023].

Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G & Kronenberg HM (2010) Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels. *Dev Cell* 19, 329–344.

Malencik DA, Sprouse JF, Swanson CA & Anderson SR (1996) Dityrosine: Preparation, Isolation, and Analysis. *Analytical Biochemistry* 242, 202–213.

Malin SA, Davis BM & Molliver DC (2007) Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc* 2, 152–160.

Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV & Sastry TP (2002) Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res* 63, 200–208.

Manolagas SC (2000) Corticosteroids and Fractures: A Close Encounter of the Third Cell Kind. *Journal of Bone and Mineral Research* 15, 1001–1005.

Mantha S, Pillai S, Khayambashi P, Upadhyay A, Zhang Y, Tao O, Pham H & Tran S (2019) Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials* 12, 3323.

Marrella A, Lee TY, Lee DH, Karuthedom S, Syla D, Chawla A, Khademhosseini A & Jang HL (2018) Engineering vascularized and innervated bone biomaterials for improved skeletal tissue regeneration. *Materials Today* 21, 362–376.

Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF & Desnick RJ (2001) Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* 28, 261–265.

Martín L, Alonso M, Girotti A, Arias FJ & Rodríguez-Cabello JC (2009) Synthesis and characterization of macroporous thermosensitive hydrogels from recombinant elastin-like polymers. *Biomacromolecules* 10, 3015–3022.

Martínez-Osorio H, Juárez-Campo M, Diebold Y, Girotti A, Alonso M, Arias FJ, Rodríguez-Cabello JC, García-Vázquez C & Calonge M (2009) Genetically engineered elastin-like polymer as a substratum to culture cells from the ocular surface. *Curr Eye Res* 34, 48–56.

Martínez-González JM, Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Díaz-Regañón J & Vázquez–Piñeiro MT (2005) Evaluation of minipigs as an animal model for alveolar distraction. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 99, 11–16.

Martz CD (1956) Stress tolerance of bone and metal. *J Bone Joint Surg Am* 38-A, 827–834.

Matta R, Yousafzai MS, Murrell M & Gonzalez AL (2021) Endothelial cell secreted metalloproteinase-2 enhances neural stem cell N-cadherin expression, clustering, and migration. *FASEB J* 35, e21311.

Matthew Cole (2018) Partie d'un diagramme de Neurone Image Vectorielle Stock - Alamy. Available at: https://www.alamyimages.fr/partie-d-un-diagramme-de-neurone-image446336244.html [Accessed January 27, 2023].

McCarthy B, Yuan Y & Koria P (2016) Elastin-like-polypeptide based fusion proteins for osteogenic factor delivery in bone healing. *Biotechnol Prog* 32, 1029–1037.

McCormick AM, Wijekoon A & Leipzig ND (2013) Specific immobilization of biotinylated fusion proteins NGF and Sema3A utilizing a photo-cross-linkable diazirine compound for controlling neurite extension. *Bioconjug Chem* 24, 1515–1526.

McDaniel JR, Mackay JA, Quiroz FG & Chilkoti A (2010) Recursive directional ligation by plasmid reconstruction allows rapid and seamless cloning of oligomeric genes. *Biomacromolecules* 11, 944–952.

McLeod K, Anderson GI, Dutta NK, Smart RSC, Voelcker NH, Sekel R & Kumar S (2006) Adsorption of bisphosphonate onto hydroxyapatite using a novel co-precipitation technique for bone growth enhancement. *J Biomed Mater Res A* 79, 271–281.

Merry JC, Gibson IR, Best SM & Bonfield W (1998) Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9, 779–783.

Meyer DE & Chilkoti A (1999) Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nature Biotechnology* 17, 1112–1115.

Meyer DE & Chilkoti A (2004) Quantification of the Effects of Chain Length and Concentration on the Thermal Behavior of Elastin-like Polypeptides. *Biomacromolecules* 5, 846–851.

Meyer DE, Kong GA, Dewhirst MW, Zalutsky MR & Chilkoti A (2001) Targeting a genetically engineered elastin-like polypeptide to solid tumors by local hyperthermia. *Cancer Res* 61, 1548–1554.

Miller IR & Great H (1972) Protein labeling by acetylation. *Biopolymers* 11, 2533–2536.

Mochi F, Scatena E, Rodriguez D, Ginebra M-P & Del Gaudio C (2022) Scaffold-based bone tissue engineering in microgravity: potential, concerns and implications. *NPJ Microgravity* 8, 45.

Montel G, Bonel G, Trombe J-C, Heughebaert J-C & Rey C (1980) Progres dans le domaine de la chimie des composes phosphores solides a structure d'apatite. Application a la biologie et au traitement des minerais. *Pure and Applied Chemistry* 52, 973–987.

Mosekilde L, Kragstrup J & Richards A (1987) Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int* 40, 318–322.

Mosteo L, Storer J, Batta K, Searle EJ, Duarte D & Wiseman DH (2021) The Dynamic Interface Between the Bone Marrow Vascular Niche and Hematopoietic Stem Cells in Myeloid Malignancy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.635189 [Accessed September 29, 2022].

Mrak E, Guidobono F, Moro G, Fraschini G, Rubinacci A & Villa I (2010) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits apoptosis in human osteoblasts by β-catenin stabilization. *J Cell Physiol* 225, 701–708.

Müller ME, Koch P, Nazarian S & Schatzker J (1990) Principles of the Classification of Fractures. In M. E. Müller, P. Koch, S. Nazarian, & J. Schatzker, eds. *The Comprehensive Classification of Fractures of Long Bones*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp.4–7. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-61261-9_2 [Accessed December 14, 2022].

Müller MM (2018) Post-Translational Modifications of Protein Backbones: Unique Functions, Mechanisms, and Challenges. *Biochemistry* 57, 177–185.

Murshed M (2018) Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a031229.

Nagwa (2022) Fiche explicative de la leçon : Synapses | Nagwa. Available at: https://www.nagwa.com/fr/explainers/626156452685/ [Accessed November 11, 2022].

Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z & Watson JT (2018) Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *Journal of Orthopaedic Trauma* 32, S7.

Nerem RM & Sambanis A (1995) Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes. *Tissue Engineering* 1, 3–13.

Nettles DL, Kitaoka K, Hanson NA, Flahiff CM, Mata BA, Hsu EW, Chilkoti A & Setton LA (2008) In Situ Crosslinking Elastin-Like Polypeptide Gels for Application to Articular Cartilage Repair in a Goat Osteochondral Defect Model. *Tissue Eng Part A* 14, 1133–1140.

Nevins M & Mellonig JT (1994) The advantages of localized ridge augmentation prior to implant placement: a staged event. *Int J Periodontics Restorative Dent* 14, 96–111.

Nezhad-Mokhtari P, Ghorbani M, Roshangar L & Soleimani Rad J (2019) Chemical gelling of hydrogels-based biological macromolecules for tissue engineering: Photo- and enzymatic-crosslinking methods. *International Journal of Biological Macromolecules* 139, 760–772.

Niedermair T, Kuhn V, Doranehgard F, Stange R, Wieskötter B, Beckmann J, Salmen P, Springorum H-R, Straub RH, Zimmer A, Grifka J & Grässel S (2014) Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of endochondral ossification. *Matrix Biology* 38, 22–35.

Niedźwiedzki T & Filipowska J (2015) Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *Journal of Molecular Endocrinology* 55, R23–R36.

Niksiar P, Su FY, Frank MB, Ogden TA, Naleway SE, Meyers MA, McKittrick J & Porter MM (2019) External Field Assisted Freeze Casting. *Ceramics* 2, 208–234.

Nirwana I, Munadziroh E, Yuliati A, Fadhila AI, Nurliana, Wardhana AS, Shariff KA & Surboyo MDC (2022) Ellagic acid and hydroxyapatite promote angiogenesis marker in bone defect. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 12, 116–120.

Nomizu M (1998) [Identification of biologically active sites in laminin an extracellular matrix protein]. *Yakugaku Zasshi* 118, 566–580.

Okawa Y & Aono M (2001) Nanoscale control of chain polymerization. *Nature* 409, 683–684.

Orimo H (2010) The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77, 4–12.

Owen R & Reilly G (2018) In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6, 134.

Pai S, Kini MS & Selvaraj R (2021) A review on adsorptive removal of dyes from wastewater by hydroxyapatite nanocomposites. *Environ Sci Pollut Res* 28, 11835–11849.

Paik WK & Kim S (1971) Protein methylation. *Science* 174, 114–119.

Paik WK & Kim S (1969) Protein methylation in rat brain in vitro. *J Neurochem* 16, 1257–1261.

Paiva dos Santos B, Garbay B, Pasqua M, Chevron E, Chinoy ZS, Cullin C, Bathany K, Lecommandoux S, Amédée J, Oliveira H & Garanger E (2019) Production, purification and characterization of an elastin-like polypeptide containing the Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) peptide for tissue engineering applications. *Journal of Biotechnology* 298, 35–44.

Pal P, Nguyen QC, Benton AH, Marquart ME & Janorkar AV (2019) Drug-Loaded Elastin-Like Polypeptide-Collagen Hydrogels with High Modulus for Bone Tissue Engineering. *Macromol Biosci* 19, e1900142.

Park J-B (2011) The use of hydrogels in bone-tissue engineering. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16, e115-118.

Park K-H & Song S-C (2005) A thermo-sensitive poly(organophosphazene) hydrogel used as an extracellular matrix for artificial pancreas. *J Biomater Sci Polym Ed* 16, 1421–1431.

Patel J, Zhu H, Menassa R, Gyenis L, Richman A & Brandle J (2007) Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. *Transgenic Res* 16, 239–249.

Peng Y, Tellier LE & Temenoff JS (2016) Heparin-based hydrogels with tunable sulfation & degradation for anti-inflammatory small molecule delivery. *Biomater Sci* 4, 1371–1380.

Pescador D, Ibáñez-Fonseca A, Sánchez-Guijo F, Briñón JG, Arias FJ, Muntión S, Hernández C, Girotti A, Alonso M, Del Cañizo MC, Rodríguez-Cabello JC & Blanco JF (2017) Regeneration of hyaline cartilage promoted by xenogeneic mesenchymal stromal cells embedded within elastin-like recombinamer-based bioactive hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 28, 115.

Petitdemange R, Garanger E, Bataille L, Bathany K, Garbay B, Deming TJ & Lecommandoux S (2017) Tuning Thermoresponsive Properties of Cationic Elastin-like Polypeptides by Varying Counterions and Side-Chains. *Bioconjug. Chem.* 28, 1403–1412.

Petitdemange R, Garanger E, Bataille L, Dieryck W, Bathany K, Garbay B, Deming TJ & Lecommandoux S (2017) Selective Tuning of Elastin-like Polypeptide Properties via Methionine Oxidation. *Biomacromolecules* 18, 544–550.

Prieto S, Shkilnyy A, Rumplasch C, Ribeiro A, Arias FJ, Rodríguez-Cabello JC & Taubert A (2011) Biomimetic calcium phosphate mineralization with multifunctional elastin-like recombinamers. *Biomacromolecules* 12, 1480–1486.

Qasim M, Chae DS & Lee NY (2020) Bioengineering strategies for bone and cartilage tissue regeneration using growth factors and stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 108, 394–411.

Raj PA, Johnsson M, Levine MJ & Nancollas GH (1992) Salivary statherin. Dependence on sequence, charge, hydrogen bonding potency, and helical conformation for adsorption to hydroxyapatite and inhibition of mineralization. *Journal of Biological Chemistry* 267, 5968–5976.

Rajpar I & Tomlinson RE (2022) Function of peripheral nerves in the development and healing of tendon and bone. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 123, 48–56.

Razavi M, Qiao Y & Thakor AS (2019) Three-dimensional cryogels for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 107, 2736–2755.

Revzin A, Russell RJ, Yadavalli VK, Koh WG, Deister C, Hile DD, Mellott MB & Pishko MV (2001) Fabrication of poly(ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography. *Langmuir* 17, 5440–5447.

Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM & Lieberman JR (1996) Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*, 39–46.

Ripamonti U, Van den Heever B & Van Wyk J (1993) Expression of the osteogenic phenotype in porous hydroxyapatite implanted extraskeletally in baboons. *Matrix* 13, 491–502.

Roberts EA (1960) Effect of glycosylation of the enzymic oxidation and translocation of flavonoids. *Nature* 185, 536–537.

Rodríguez-Cabello JC, González de Torre I, Ibañez-Fonseca A & Alonso M (2018) Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews* 129, 118–133.

Rohman G, Changotade S, Frasca S, Ramtani S, Consalus A, Langueh C, Collombet J-M & Lutomski D (2019) In vitro and in vivo proves of concept for the use of a chemically cross-linked poly(ester-urethane-urea) scaffold as an easy handling elastomeric biomaterial for bone regeneration. *Regen Biomater* 6, 311–323.

Romeo SG, Alawi KM, Rodrigues J, Singh A, Kusumbe AP & Ramasamy SK (2019) Endothelial proteolytic activity and interaction with non-resorbing osteoclasts mediate bone elongation. *Nat Cell Biol* 21, 430–441.

Rosselin M, Xiao Y, Belhomme L, Lecommandoux S & Garanger E (2019) Expanding the Toolbox of Chemoselective Modifications of Protein-Like Polymers at Methionine Residues. *ACS Macro Lett.* 8, 1648–1653.

Roy DM & Linnehan SK (1974) Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature* 247, 220–222.

Ruoslahti E (1996) Rgd and Other Recognition Sequences for Integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 697–715.

Ruoslahti E & Pierschbacher MD (1987) New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins. *Science* 238, 491–497.

Russell FA, King R, Smillie S-J, Kodji X & Brain SD (2014) Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 94, 1099–1142.

dos S Kotake BG, Salzedas LMP, Ervolino E, Calzzani RAJ, Sebald W & Issa JPM (2015) Bone Recuperation After rhBMP-2 Insertion in Alcoholic Animals-Experimental Study. *Curr Pharm Des* 21, 3557–3564.

Sandt KE (1960) The present status of contact lenses. *J Lancet* 80, 99–102.

Saxholm HJ, Pestana A, O'Connor L, Sattler CA & Pitot HC (1982) Protein acetylation. *Mol Cell Biochem* 46, 129–153.

Schaffner P & Dard MM (2003) Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cell Mol Life Sci* 60, 119–132.

Schipani E, Maes C, Carmeliet G & Semenza GL (2009) Regulation of Osteogenesis-Angiogenesis Coupling by HIFs and VEGF. *Journal of Bone and Mineral Research* 24, 1347–1353.

Schipperus R, Teeuwen RLM, Werten MWT, Eggink G & Wolf FA de (2009) Secreted production of an elastin-like polypeptide by Pichia pastoris. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 293–301.

Schlaubitz S, Derkaoui SM, Marosa L, Miraux S, Renard M, Catros S, Le Visage C, Letourneur D, Amédée J & Fricain J-C (2014) Pullulan/dextran/nHA Macroporous Composite Beads for Bone Repair in a Femoral Condyle Defect in Rats. *PLoS One* 9, e110251.

Schlesinger DH, Hay DI & Levine MJ (2009) Complete primary structure of statherin, a potent inhibitor of calcium phosphate precipitation, from the saliva of the monkey, Macaca arctoides. *International Journal of Peptide and Protein Research* 34, 374–380.

Schlund M, Depeyre A, Kotagudda Ranganath S, Marchandise P, Ferri J & Chai F (2022) Rabbit calvarial and mandibular critical-sized bone defects as an experimental model for the evaluation of craniofacial bone tissue regeneration. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery* 123, 601–609.

Schräder CU, Heinz A, Majovsky P, Mayack BK, Brinckmann J, Sippl W & Schmelzer CEH (2018) Elastin is heterogeneously cross-linked. *Journal of Biological Chemistry* 293, 15107–15119.

Seban A (2008) Les greffons osseux autogènes et leurs substituts. In *Greffes osseuses et implants*. Elsevier, pp.31–64. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9782294704970500033 [Accessed November 17, 2022].

Seifried BM, Cao J & Olsen BD (2018) Multifunctional, High Molecular Weight, Post-Translationally Modified Proteins through Oxidative Cysteine Coupling and Tyrosine Modification. *Bioconjugate Chem.* 29, 1876–1884.

Serre CM, Farlay D, Delmas PD & Chenu C (1999) Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone* 25, 623–629.

Shao G, Hanaor DAH, Shen X & Gurlo A (2020) Freeze Casting: From Low-Dimensional Building Blocks to Aligned Porous Structures—A Review of Novel Materials, Methods, and Applications. *Advanced Materials* 32, 1907176.

Shiekh PA, Andrabi SM, Singh A, Majumder S & Kumar A (2021) Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications. *European Polymer Journal* 144, 110234.

Shih H, Liu H-Y & Lin C-C (2017) Improving gelation efficiency and cytocompatibility of visible light polymerized thiol-norbornene hydrogels via addition of soluble tyrosine. *Biomater Sci* 5, 589–599.

Shirzaei Sani E, Portillo-Lara R, Spencer A, Yu W, Geilich BM, Noshadi I, Webster TJ & Annabi N (2018) Engineering Adhesive and Antimicrobial Hyaluronic Acid/Elastin-like Polypeptide Hybrid Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *ACS Biomater Sci Eng* 4, 2528–2540.

Shoji S & Kubota Y (1989) [Function of protein myristoylation in cellular regulation and viral proliferation]. *Yakugaku Zasshi* 109, 71–85.

Shu XZ, Liu Y, Luo Y, Roberts MC & Prestwich GD (2002) Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules* 3, 1304–1311.

Silva DI, Santos BP dos, Leng J, Oliveira H & Amédée J (2017) Dorsal root ganglion neurons regulate the transcriptional and translational programs of osteoblast differentiation in a microfluidic platform. *Cell Death Dis* 8, 3209.

Silva GA, Czeisler C, Niece KL, Beniash E, Harrington DA, Kessler JA & Stupp SI (2004) Selective Differentiation of Neural Progenitor Cells by High-Epitope Density Nanofibers. *Science* 303, 1352–1355.

Singh YP & Dasgupta S (2022) Gelatin-based electrospun and lyophilized scaffolds with nano scale feature for bone tissue engineering application: review. *J Biomater Sci Polym Ed* 33, 1704–1758.

Sisask G, Bjurholm A, Ahmed M & Kreicbergs A (1995) Ontogeny of sensory nerves in the developing skeleton. *The Anatomical Record* 243, 234–240.

site Inserm (2017) Biomatériaux · Inserm, La science pour la santé. *Inserm*. Available at: https://www.inserm.fr/dossier/biomateriaux/ [Accessed December 19, 2022].

Ślósarczyk A, Paluszkiewicz C, Gawlicki M & Paszkiewicz Z (1997) The FTIR spectroscopy and QXRD studies of calcium phosphate based materials produced from the powder precursors with different CaP ratios. *Ceramics International* 23, 297–304.

Smith ML, Lindbo JA, Dillard-Telm S, Brosio PM, Lasnik AB, McCormick AA, Nguyen LV & Palmer KE (2006) Modified Tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology* 348, 475–488.

Soffer RL (1973) Post-translational modification of proteins catalyzed by aminoacyl-tRNA-protein transferases. *Mol Cell Biochem* 2, 3–14.

Soliman AM & Barreda DR (2022) Acute Inflammation in Tissue Healing. *Int J Mol Sci* 24, 641.

Sommerfeldt DW & Rubin CT (2001) Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 10 Suppl 2, S86-95.

Song D, Jiang X, Zhu S, Li W, Khadka A & Hu J (2012) Denervation impairs bone regeneration during distraction osteogenesis in rabbit tibia lengthening. *Acta Orthop* 83, 406–410.

de Sousa JP, Carvalho RG, Barbosa-Martins LF, Torquato RJS, Mugnol KCU, Nascimento FD, Tersariol ILS & Puppin-Rontani RM (2019) The Self-Assembling Peptide P11-4 Prevents Collagen Proteolysis in Dentin. *J Dent Res* 98, 347–354.

Sp M, Ss R & Ja H (1993) Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67-kilodalton laminin receptor with alpha-actinin and vinculin. *The Journal of biological chemistry* 268. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8463322/ [Accessed December 1, 2022].

Spicer CD & Davis BG (2014) Selective chemical protein modification. *Nat Commun* 5, 4740.

Spiro RG, Lucas F & Rudall KM (1971) Glycosylation of hydroxylysine in collagens. *Nat New Biol* 231, 54–55.

Sridharan R, Cameron AR, Kelly DJ, Kearney CJ & O'Brien FJ (2015) Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Materials Today* 18, 313–325.

Srivastava GK, Martín L, Singh AK, Fernandez-Bueno I, Gayoso MJ, Garcia-Gutierrez MT, Girotti A, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC & Pastor JC (2011) Elastin-like recombinamers as substrates for retinal pigment epithelial cell growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 97A, 243–250.

Starcher B, Conrad N, Hinek A & Hill CH (1999) Antibody Raised to AKAAAKAAAKA Sequence on Tropoelastin Recognizes Tropoelastin but not Mature Crosslinked Elastin: A New Tool in Metabolic and Structural Studies of Elastogenesis. *Connective Tissue Research* 40, 273–282.

Starcher B & Percival S (1985) Elastin turnover in the rat uterus. *Connect Tissue Res* 13, 207–215.

Stevens KR, Einerson NJ, Burmania JA & Kao WJ (2002) In vivo biocompatibility of gelatin-based hydrogels and interpenetrating networks. *J Biomater Sci Polym Ed* 13, 1353–1366.

Stucker S, Chen J, Watt FE & Kusumbe AP (2020) Bone Angiogenesis and Vascular Niche Remodeling in Stress, Aging, and Diseases. *Front Cell Dev Biol* 8, 602269.

Su F, Mok J & McKittrick J (2019) Radial-Concentric Freeze Casting Inspired by Porcupine Fish Spines. *Ceramics* 2, 161–179.

Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK & Yamada Y (1989) A Synthetic Peptide Containing the IKVAV Sequence from the A Chain of Laminin Mediates Cell Attachment, Migration, and Neurite Outgrowth. *Journal of Biological Chemistry* 264, 16174–16182.

Tejeda-Montes E, Klymov A, Nejadnik MR, Alonso M, Rodriguez-Cabello JC, Walboomers XF & Mata A (2014) Mineralization and bone regeneration using a bioactive elastin-like recombinamer membrane. *Biomaterials* 35, 8339–8347.

Tibbitt MW & Anseth KS (2009) Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 655–663.

Trabbic-Carlson K, Setton LA & Chilkoti A (2003) Swelling and Mechanical Behaviors of Chemically Cross-Linked Hydrogels of Elastin-like Polypeptides. *Biomacromolecules* 4, 572–580.

Tuzmen C, Verdelis K, Weiss L & Campbell P (2018) Crosstalk between substance P and calcitonin gene-related peptide during heterotopic ossification in murine Achilles tendon. *Journal of Orthopaedic Research* 36, 1444–1455.

Urry DW (1997) Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers †. *The Journal of Physical Chemistry B* 101, 11007–11028.

Van In (2022) BIO 5 pour tous, Chapitre 3.

Verrier S, Pallu S, Bareille R, Jonczyk A, Meyer J, Dard M & Amédée J (2002) Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials* 23, 585–596.

Vila M, García A, Girotti A, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC, González-Vázquez A, Planell JA, Engel E, Buján J, García-Honduvilla N & Vallet-Regí M (2016) 3D silicon doped hydroxyapatite scaffolds decorated with Elastin-like Recombinamers for bone regenerative medicine. *Acta Biomaterialia* 45, 349–356.

Vollette C-A (2020) Les neuromythes : nous utilisons 10 % de notre cerveau. *Pensée Artificielle*. Available at: https://penseeartificielle.fr/10-cerveau/ [Accessed November 10, 2022].

Wagenseil JE & Mecham RP (2009) Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 89, 957–989.

Wang E, Lee S-H & Lee S-W (2011) Elastin-like polypeptide based hydroxyapatite bionanocomposites. *Biomacromolecules* 12, 672–680.

Wang R, de Kort BJ, Smits AIPM & Weiss AS (2019) Elastin in Vascular Grafts. In B. Walpoth, H. Bergmeister, G. Bowlin, D. Kong, J. Rotmans, & P. Zilla, eds. *Tissue-Engineered Vascular Grafts*. Reference Series in Biomedical Engineering. Cham: Springer International Publishing, pp.1–32. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-71530-8_13-1 [Accessed October 20, 2022].

Wei SM, Katona E, Fachet J, Fülöp T, Robert L & Jacob MP (1998) Epitope specificity of monoclonal and polyclonal antibodies to human elastin. *Int Arch Allergy Immunol* 115, 33–41.

Wheeler TS, Sbravati ND & Janorkar AV (2013) Mechanical & cell culture properties of elastin-like polypeptide, collagen, bioglass, and carbon nanosphere composites. *Ann Biomed Eng* 41, 2042–2055.

Williams DF (2008) On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29, 2941–2953.

Wise SG & Weiss AS (2009) Tropoelastin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 494–497.

Wu A-M, Bisignano C, James SL, Abady GG, Abedi A, Abu-Gharbieh E, Alhassan RK, Alipour V, Arabloo J, Asaad M, Asmare WN, Awedew AF, Banach M, Banerjee SK, Bijani A, *et al.*, (2021) 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. *The Lancet Healthy Longevity* 2, e580–e592.

Wu Y, Chen YX, Yan J, Yang S, Dong P & Soman P (2015) Fabrication of conductive polyaniline hydrogel using porogen leaching and projection microstereolithography. *J Mater Chem B* 3, 5352–5360.

Xiao J, Addabbo R, Lauer J, Fields G & Baum J (2010) Local Conformation and Dynamics of Isoleucine in the Collagenase Cleavage Site Provide a Recognition Signal for Matrix Metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 285, 34181–90.

Xiao Y, Chinoy ZS, Pecastaings G, Bathany K, Garanger E & Lecommandoux S (2020) Design of Polysaccharide-b-Elastin-Like Polypeptide Bioconjugates and Their Thermoresponsive Self-Assembly. *Biomacromolecules* 21, 114–125.

Xu D, Asai D, Chilkoti A & Craig SL (2012) Rheological Properties of Cysteine-Containing Elastin-Like Polypeptide Solutions and Hydrogels. *Biomacromolecules* 13, 2315–2321.

Xu J, Wang J, Chen X, Li Y, Mi J & Qin L (2020) The Effects of Calcitonin Gene-Related Peptide on Bone Homeostasis and Regeneration. *Current Osteoporosis Reports* 18, 1–12.

Yamakura F & Ikeda K (2006) Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* 14, 152–161.

Zhang F, Cheng Z, Ding C & Li J (2021) Functional biomedical materials derived from proteins in the acquired salivary pellicle. *J Mater Chem B* 9, 6507–6520.

Zhang L, Forgham H, Shen A, Wang J, Zhu J, Huang X, Tang S-Y, Xu C, Davis TP & Qiao R (2022) Nanomaterial integrated 3D printing for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* 10, 7473–7490.

Zhao H, Ibarboure E, Ibrahimova V, Xiao Y, Garanger E & Lecommandoux S (2021) Spatiotemporal Dynamic Assembly/Disassembly of Organelle-Mimics Based on Intrinsically Disordered Protein-Polymer Conjugates. *Adv Sci (Weinh)* 8, 2102508.

Zhao H, Ibrahimova V, Garanger E & Lecommandoux S (2020) Dynamic Spatial Formation and Distribution of Intrinsically Disordered Protein Droplets in Macromolecularly Crowded Protocells. *Angewandte Chemie International Edition* 59, 11028–11036.

Zheng S, Zhang K, Tian S, He X & Zhang Y (2015) Identification of Two Novel Modifications at Tryptophan Residues. *J Am Soc Mass Spectrom* 26, 1787–1790.

Zheng X-F, Zhao E-D, He J-Y, Zhang Y-H, Jiang S-D & Jiang L-S (2016) Inhibition of substance P signaling aggravates the bone loss in ovariectomy-induced osteoporosis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 122, 112–121.

Zhu D, Wang H, Trinh P, Heilshorn SC & Yang F (2017) Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration. *Biomaterials* 127, 132–140.

Zigdon-Giladi H, Rudich U, Michaeli Geller G & Evron A (2015) Recent advances in bone regeneration using adult stem cells. *World J Stem Cells* 7, 630–640.