



HAL
open science

Utilisation du pullulane et du dextrane en ingénierie tissulaire : application à la régénération osseuse guidée

Naïma Ahmed Omar

► **To cite this version:**

Naïma Ahmed Omar. Utilisation du pullulane et du dextrane en ingénierie tissulaire : application à la régénération osseuse guidée. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0376 . tel-04498601

HAL Id: tel-04498601

<https://theses.hal.science/tel-04498601>

Submitted on 11 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.

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

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ INTERFACE CHIMIE-BIOLOGIE

Par Naïma AHMED OMAR

**UTILISATION DU PULLULANE ET DU DEXTRANE EN
INGÉNIERIE TISSULAIRE : APPLICATION À LA
RÉGÉNÉRATION OSSEUSE GUIDÉE**

Sous la direction de : Jean-Christophe FRICAIN

Soutenue le 11 Décembre 2023

Membres du jury :

Mme GORIN, Caroline, MCU-PH
M. PAUTHE, Emmanuel, PU
Mme CHAUX, Anne-Gaëlle, PU-PH
M. GUIGNANDON, Alain, DR
M. LETOURNEUR, Didier, DR
Mme FENELON, Mathilde, MCU-PH
M. FRICAIN, Jean-Christophe, PU-PH

Université Paris-Cité
Université de Cergy-Pontoise
Université de Nantes
Université de Saint-Étienne
Université Paris-Cité
Université de Bordeaux
Université de Bordeaux

Rapportrice
Rapporteur
Présidente du jury
Examineur
Invité
Invitée
Directeur de thèse

Utilisation du pullulane et du dextrane en ingénierie tissulaire : application à la régénération osseuse guidée

Résumé

La régénération osseuse guidée (ROG) est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour la régénération des pertes de substances osseuses maxillaires et mandibulaires. Cette technique repose sur l'utilisation d'une membrane jouant un rôle barrière pour préserver le défaut osseux de l'infiltration cellulaire des tissus mous environnants. Deux grands types de membranes sont retrouvées en pratique clinique : les membranes non-résorbables et les membranes résorbables. Les membranes dérivées de substances naturelles et plus particulièrement celles à base de collagène sont les plus utilisées mais leur mauvaise tenue mécanique et le potentiel risque de transmission d'agents pathogènes limitent leur utilisation. Ces travaux de thèse ont eu pour objectif de développer une membrane résorbable issue de polysaccharides (le pullulane et le dextrane) pour la ROG. La première partie de ces travaux s'est intéressée à la caractérisation de deux membranes polysaccharidiques combinées ou non à des particules d'hydroxyapatite (HA). L'évaluation *in vitro* et *in vivo* de leur toxicité, ainsi que de leur potentiel ostéogénique a été réalisée chez le rat et a permis de sélectionner la membrane combinée à de l'HA pour la suite des travaux. Dans une seconde partie, un nouveau modèle pré-clinique maxillaire a été développé chez le rat pour l'évaluation de biomatériaux pour la ROG en chirurgie orale et maxillo-faciale. La membrane polysaccharidique précédemment sélectionnée a été implantée dans ce défaut et comparée à une membrane couramment utilisée en pratique clinique pour évaluer son intérêt en ROG. Bien que des études pré-cliniques utilisant de plus grands mammifères soient requises pour un transfert vers la clinique, le modèle proposé ici permet une première approche pour le développement de matériaux destinés à la ROG. La membrane polysaccharidique combinée à de l'HA semble prometteuse pour une utilisation en régénération osseuse. Afin d'améliorer sa bioactivité, son association avec des principes actifs pour favoriser l'angiogenèse et l'ostéogenèse sera développée.

Mots clés : polysaccharides; régénération osseuse; modèles pré-cliniques

BioTis, INSERM UMR 1026

Université de Bordeaux, Bâtiment Bordeaux Biologie Santé – case postale 45, 2 rue Docteur Hoffmann Martinot

Use of pullulan and dextran for guided bone regeneration application

Abstract

Guided bone regeneration (GBR) procedures can be applied for bone loss (due to trauma, cancer or pathology). A barrier membrane is used to protect the bone defect from cellular infiltration by surrounding tissues. A wide range of membranes are already used in clinics, especially those derived from natural components. Collagen-based membranes are the most widely used membranes, but their poor mechanical strength and the potential risk of pathogen transmission limit their use. The aim of this thesis was to develop a resorbable membrane based on polysaccharides (pullulan and dextran). The first part of the work focused on characterizing two polysaccharide membranes, combined or not with hydroxyapatite (HA) particles. *In vitro* and *in vivo* membrane toxicity were assessed in rats followed by the evaluation of their potent osteogenic properties. The membrane reinforced with HA particles has shown interest for ROG. The second part of this work was devoted to the development of a preclinical model closer to clinical expectations. An alveolar defect in the rat maxilla was studied longitudinally by micro-computed tomography. The previously formulated polysaccharide membrane was combined with a bone substitute and tested in the rat's maxillary to assess its interest for GBR procedure. Although preclinical studies using larger animals are required for transfer to clinics, the proposed model provided a first approach to the development of GBR materials. The polysaccharide membrane combined with HA particles seems promising for use in bone regeneration. Its combination to active principles may reinforce its potential bioactivity for further investigations for GBR procedures.

Keywords : polysaccharide; bone regeneration; preclinical studies

BioTis, INSERM UMR 1026

Université de Bordeaux, Bâtiment Bordeaux Biologie Santé – case postale 45, 2 rue Docteur Hoffmann Martinot

Une thèse, c'est un apprentissage constant sur soi. C'est vouloir constamment abandonner mais toujours chercher à persévérer et à se dépasser. Une thèse, c'est un projet commun et c'est grâce au soutien et à la présence d'un grand nombre de personnes que tout cela a pu être possible. Je souhaiterais exprimer ici ma profonde reconnaissance et remercier toutes les personnes ayant été impliquées de près comme de loin dans ce projet.

AUX MEMBRES DE MON JURY,

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, le Dr Caroline Gorin, le Pr Emmanuel Pauthe, le Pr Anne-Gaëlle Chaux, le Dr Alain Guignandon, le Dr Didier Letourneur et le Dr Mathilde Fenelon pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.

À MON DIRECTEUR DE THÈSE, le Pr Jean-Christophe Fricain,

Je tiens à vous remercier pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire BioTis ainsi que pour vos précieux conseils tout au long de ce travail de recherche. Il y a eu des moments de doutes mais vous avez su me tirer vers le haut à chaque fois.

AUX PERSONNES IMPLIQUÉES DANS LE PROJET GLYCOMB,

Je tiens ensuite à remercier les personnes impliquées directement dans ce projet, Mathilde Fenelon, Joëlle Amédée et Didier Letourneur.

Merci à toi Mathilde, pour le soutien que tu m'as apporté pendant ces 3 ans. J'ai énormément appris à tes côtés. Merci pour le temps consacré à corriger mes articles, mes abstracts et surtout mon manuscrit. Je me souviendrai toujours de ces temps passés en salle de chirurgie à prier pour que l'anesthésie fonctionne... Merci aussi pour tous tes conseils avisés qui m'ont aidée et, ce, malgré la difficulté de ce projet.

Merci à toi Joëlle, pour avoir été un pilier dans ce projet et avoir toujours pu donner de ton temps pour des conseils ou des corrections d'articles. Je suis très heureuse d'avoir pu travailler à tes côtés. Merci aussi pour ton implication dans le laboratoire BioTis et pour les supers pique-niques organisés chez toi pour faire vivre cet esprit d'équipe.

Merci à toi, Didier, tout comme Joëlle, tu as tout autant été impliqué dans ce projet. Merci pour tes précieux conseils et corrections pour améliorer mes travaux. Merci aussi de m'avoir accueilli au sein de SILTISS mais aussi dans ton laboratoire, le LVTS à Paris, et de m'avoir permis de garder mon petit côté de chimiste.

À MES COLLABORATRICES ET COLLABORATEURS,

Je tiens tout d'abord à remercier mes collaboratrices et collaborateurs de l'entreprise SILTISS. Merci à Laurent, Céline, Romain, Sandrine, Camille, Léa et Charlotte pour votre accueil lors de mes quelques visites à SILTISS. Merci aussi à vous pour ces échanges et la production des matériaux. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous !

Je tiens ensuite à remercier l'équipe 3 du LVTS pour leur accueil chaleureux ! Merci à Teresa, Paola, Chloé, Thibaut, Albane, Rachida, Elliot et Mathilde d'avoir toujours su bien m'accueillir lors de mes quelques visites sur Paris. Je me suis sentie comme dans une deuxième maison ! Je tiens plus particulièrement à te remercier Mathilde Maillard (il va falloir commencer à préciser, j'ai rencontré beaucoup de Mathilde !) d'avoir été présente sur cette dernière année de thèse. Ta bienveillance, ta passion, ta joie de vivre et ton amour pour la science m'ont beaucoup inspiré durant cette année. Après avoir été ta collègue, j'ai le sentiment d'avoir aussi trouvé une amie, merci pour tout !

Merci à Laëtitia, Fadila, Anthony, Julhy et Véronique de l'Animalerie conventionnelle pour leur précieuse aide et pour avoir toujours eu le sourire. Merci plus particulièrement à Laëtitia et Fadila qui m'ont appris à dompter ma peur des petits (gros ! Très gros !) rats. Merci à tous pour votre bienveillance et pour avoir toujours répondu à mes requêtes.

Merci également à Fanny, Coralie, Céline et Benjamin de l'animalerie de l'IHU Liry de Pessac. Je vous remercie de nous avoir accueilli dans vos locaux et d'avoir pris soin de nous aider à chaque fois que nous en avons besoin.

Je remercie Richard Walton pour son aide lors des acquisitions *in vivo* de microscanner que nous avons eu la chance d'utiliser à l'IHU Liry.

Je tiens aussi à remercier Lofti Slimani pour les acquisitions *ex vivo* réalisées à la plateforme d'imagerie à la Faculté de chirurgie orale de Montrouge.

À MES COLLÈGUES DE BIOTIS,

J'ai eu l'occasion de rencontrer énormément de personnes dans ce laboratoire qui m'ont tant apporté aussi bien sur le plan scientifique que personnel. Cette thèse aurait été bien plus difficile à vivre sans vous.

Je tiens à remercier le directeur du laboratoire BioTis, Nicolas L'Heureux, pour ses précieux conseils sur mes travaux de thèse.

Je tiens ensuite à remercier les chercheurs, ingénieurs et techniciens de BioTis, Olivier, Claudine, Hélène, Delphine, Béatrice, Damien, Sylvie, Martine, Robin, Jérôme, Betty, Rémi,

Patrick mais aussi ceux de l'ART Hugo, Charles, Marie-Laure, Nathalie, Julie, Léo, Malou pour nos échanges et leur bienveillance.

Je tiens également à remercier les cliniciens du laboratoire, Sylvain, Rawen, Olivia, Raphaël, Claire.

Je tiens aussi à te remercier Evelyne pour ta gentillesse et toute la gestion financière sur ce projet. Merci plus récemment à toi Julie qui a récemment rejoint la gestion.

Merci aussi à mes stagiaires, Gauthier et Maël, pour leurs curiosité lors de leurs stage de Liscence.

Merci aussi aux autres étudiants de Master Mathilde (Devun) et Paul pour leur gentillesse et les discussions autours de mes travaux.

Je tiens maintenant à remercier ceux qui, après avoir été collègues, sont également devenus des amis, qu'ils soient toujours au laboratoire ou partis vers de nouvelles aventures.

Je souhaiterais d'abord remercier les personnes qui sont parties.

Merci à toi Bruno, tu as été présent une partie de ma thèse et tu as toujours été bienveillant à mon égard. Tu as eu la patience de me montrer l'art de l'histologie et je t'en suis infiniment reconnaissante ! Ta bonne humeur m'a beaucoup manqué après ton départ mais je sais qu'une grande carrière t'attends !

Merci à toi Lisa, tu me manques depuis le Japon ! Tes précieux conseils pour affronter la difficulté du Doctorat m'ont énormément apporté. Merci pour ces petites pauses sucrés-salés chez toi. J'espère qu'on se reverra bientôt !

Merci à toi Adeline, pour ta gentillesse et ta bienveillance. Merci d'avoir été présente dans les bons comme les mauvais moments !

Merci à toi aussi Nadia, mon faux homonyme du laboratoire, pour ta gentillesse et ta bienveillance. Tu avais bien raison, je commence à en voir le bout. Bientôt au laboratoire il n'y aura plus de soucis pour nous différencier 😊.

Merci à toi Alice, tu as été présente au début de ma thèse, je me souviendrais toujours du gainage le midi et les échanges sur nos mangas du moment !

Merci aussi à la team NLH, Nicolas Da Silva, Marie, Yoann et Laure pour votre gentillesse et tous ces bons moments passés ensemble.

Il faut maintenant que je remercie mon bureau de cœur, le bureau des Légendes. Merci à vous, Nicolas, Mathilde (Palmier), Quentin et Joanna ! Ça y est je suis la dernière résistante, et il est bientôt temps pour moi de m'en aller. Je ne sais pas comment vous remercier, vous m'avez énormément apporté, tant scientifiquement que personnellement. Merci pour vos mots

REMERCIEMENTS

réconfortants et d'avoir toujours répondu présents même à distance. J'espère qu'on se retrouvera bientôt !

Je souhaite ensuite remercier toutes ces personnes encore présentes au laboratoire et que je considère un peu (beaucoup) comme des amis.

Un grand merci aux doctorants, Théo, Camille (Déchelette), Mathilde (Palmier), Ghannaa, Romane, Gaëtan, Aurélien et Léa. On va tous passer par cette étape horrible... la soutenance. Je suis la première de la cuvée. Je vous souhaite à tous bien du courage ! Merci pour tous ces moments à essayer de se serrer les coudes avec nos « PhD meetings » (ah... quel échec...). A bientôt dans le bocal !

Merci à vous, Micaela, Maude et Diane pour vos lumières en histologie, je pense que nous sommes est liées par le saint microtome et la coloration. Merci d'avoir en plus été des collègues en or, de bonnes amies ! Ce fut un réel plaisir de discuter et apprendre à vos côtés !

Merci à toi Camille (Blanchard) pour ces memes/vidéos partagés qui m'ont toujours remonté le moral. Tu as toujours su trouver les mots pour me reconforter et je t'en serais éternellement reconnaissante ! Merci pour le temps que tu as pris à nous initier avec Jéssica aux joies de la biologie moléculaire.

Merci à vous Cécile, Julien et Elina pour ces escapades gastronomiques et revigorantes ! Mais aussi pour les pauses-café les matin où la motivation n'était pas au RDV. Je tiens plus particulièrement à te remercier Elina, même si parfois tu me disputes, tu as toujours été présente pour me reconforter (je pense que les gens vont croire que je pleurais tout le temps...). Merci de m'avoir fait découvrir tout ces chocolats et thés dans mon second bureau avec Camille D. et Jéssica. Je n'oublierai jamais tous ces bons moments et j'espère qu'il y en aura encore plein d'autres !

Et maintenant le plus difficile. Je souhaiterais te remercier Jéssica alias Madame. J'espère que tu comprendras les mots qui suivent, sinon une traduction approximative en portugais suivra. Tu es arrivée à une période très difficile, pendant ma dernière année de Doctorat. Je pense sincèrement que sans toi cette année aurait été impossible. Tu m'as énormément apporté, aussi bien professionnellement qu'amicalement. Tu es une personne incroyablement forte et persévérante. Merci de toujours avoir eu le sourire et les mots justes pour me permettre d'aller de l'avant. Cette thèse c'est aussi grâce à toi, alors merci. Agora, vou falar português e quero te dizer : tolo, tola, tolinha e tolito 😊.

À MES AMI.E.S. DE LONGUE DATE,

J'ai eu la chance de rencontrer des personnes formidables tout au long de mon parcours scolaire et universitaire. Que ce soit depuis le collège, la prépa ou l'école d'ingé, je tiens à vous remercier pour ce précieux lien d'amitié qui dure depuis tant d'années.

Je tiens à remercier mes amies ENSCMIENNES préférées, alias Les Kardachamps, pour ces petites escapades le temps d'un week-end pour oublier les aléas de la thèse et décompresser. Merci à vous toutes, Aurélie, Laurine, Viviane, Cécile, Jeanne, Lenaïg et Majda pour tous ces moments partagés ensemble (surtout autour d'incroyables repas). Je suis la petite dernière à soutenir, j'espère que je serais à la hauteur des trois autres docteurs de ce groupe ;p (Laurine, Aurélie et Viviane me jugez pas trop lors de la soutenance hein !).

À mes ami.e.s de toujours, Louise, Élise, Salomé, Camille, Lisa, João et Morgane. Merci de m'avoir soutenue dans mes choix saugrenus d'études et d'avoir toujours su me remonter le moral. Malgré la distance, on a toujours pu se retrouver et partager de super moments ! J'espère que vous serez fière de votre petite Naïma, la seule valeur sûre de ce groupe ;p (je te vois venir Lisa, t'inquiètes pas tu gères aussi !). J'aimerais maintenant particulièrement remercier ma petite Morgane, car toi tu as été présente physiquement pendant ces 3 années de thèse. Je ne sais pas comment t'exprimer ma gratitude, ces petits restos/verres après le boulot ont grandement participé à mon bien-être pour tenir pendant ces 3 années. Merci d'avoir été mon cobaye de mes recettes douteuses (ou pas) ;p. Je tiens également à te remercier Thibaut pour ta bienveillance et ton franc-parler. Tu as toujours été à l'écoute avec Morgane pendant mes nombreux doutes (personnel ou professionnel) et je tiens à t'en remercier.

À mon amie de prépa, Agathe, je tiens à te remercier pour ta présence depuis l'Allemagne ! Toi aussi tu es passée par les méandres du doctorat. Nos petits appels téléphoniques du soir m'ont grandement aidé à aller de l'avant. Merci pour toutes ces petites attentions qui font que je l'espère, nous resterons toujours amies ! Je te souhaite le meilleur pour l'avenir après les années sombres que tu as connues.

À ma meilleure amie Laura, je tiens à te remercier pour ta gentillesse et ta bienveillance envers ta Nanou chérie. On n'a malheureusement pas eu l'occasion de beaucoup se voir pendant ces 3 ans mais tu as toujours su être présente et organiser de superbes journées pour m'aider à décompresser ! Merci d'être comme tu es, je suis tellement heureuse d'être ton témoin et je vous souhaite beaucoup de bonheur avec ton chéri !

AUX MAGNIFIQUES ANIMAUX DE COMPAGNIE DE MES AMIS,

C'est un peu bizarre de remercier des animaux de compagnie qui ne sont pas les siens, mais j'ai eu la chance de pouvoir rencontrer et/ou garder Pep's (le meilleur), Pawlie, Tigrou, Luci et Luna pendant mon doctorat et j'en suis heureuse. Une pensée également à Zé, le représentant de tous ces petits rats, sans qui, ces travaux auraient été bien maigres.

À MA FAMILLE. Je ne sais pas par où commencer, ni comment exprimer ma reconnaissance envers ma famille mais je ferai de mon mieux !

Papounet, merci d'être comme tu es et merci de supporter les sauts d'humeur de ta seule et unique fille chérie. On a traversé des périodes un peu compliquées ces dernières années mais tu as toujours su garder le sourire et la force ! Tu es une grande source d'inspiration. Merci pour ta présence, ton soutien et j'espère te rendre fier car c'est grâce à vous si j'ai pu en arriver là.

A mes frères. Vous êtes de sacrés imbéciles mais je crois que maman voudrait que je vous remercie (mais pourquoi ?)... Camil, petit frère, ça n'a pas été une période très facile pour toi ces dernières années et je suis désolée de ne pas avoir pu jouer mon rôle de grande sœur comme il se doit. Merci d'avoir su me soutenir à ta manière même avec ton côté grincheux. Sans toi je n'aurais jamais pu m'installer à Bordeaux ! Merci d'être comme tu es et d'être attentionné avec ta grande sœur (je me souviendrais pour toujours du chargeur de Switch merci encore! 😊). Je suis fière d'être la grande sœur d'un petit frère incroyable ! Je te souhaite de t'accomplir dans tes choix de carrière, je suis sûre que tu trouveras ce qui te passionne.

Bastoi, mon grand frère, t'as essayé de me copier en passant ta thèse d'exercice et en plus avant moi quoi... Même si on s'est un peu éloigné ces dernières années à cause de nos (fausses) fonctions, je tiens à te remercier pour toutes ces discussions et questionnements scientifiques. Merci d'être comme tu es, je suis fière d'être ta stah. J'espère te rendre tout aussi fière.

Et comme on dit, le meilleur pour la fin, Maman, je tiens à te remercier profondément pour tout ce que tu as fait pour ta seule et unique petite puce. Merci pour le temps passé à m'écouter au téléphone pour me plaindre que telle ou telle expérience n'avait pas fonctionné. Merci d'avoir pris du temps pour relire mes erreurs d'orthographe et de syntaxe dans tout ce manuscrit. Tu n'es pas du domaine mais tu t'es toujours démenée pour m'aider à trouver de la bibliographie ou à comprendre certains processus (finalement... est-ce la ROG ou la RTG qui a été établie en premier ? Je ne suis même pas sûre qu'il y ait la réponse dans ce manuscrit...). Il devrait bientôt y avoir 2 docteurs dans la maison et tout ça c'est grâce à ta persévérance et à ton soutien. Je te remercie de m'avoir permis de quitter le cocon familial pour suivre mon rêve ! Je t'aime infiniment, merci pour tout Maman.

A MES CHÈRES ET CHERS PARTIS TROP TÔT,

Je tiens maintenant à avoir une pensée pour mes grands parents, Dada, Nana, Papi et Mamie Justine. Je n'ai pas vraiment eu la chance de vous connaître mais j'espère que là-haut vous veillez sur vos enfants chéris. Mamie Justine ton départ est un peu plus récent que les autres, tu nous as quitté cet été. Quand j'étais petite tu voulais que je sois docteure (pour te soigner). J'espère que ce sera chose faite en décembre et que de là-haut tu seras fière de ta petite-fille. Reposez en paix, je vous aime.

Résumé	III
Abstract	IV
ABRÉVIATIONS	XIV
TABLE DES ILLUSTRATIONS	XVI
TABLE DES TABLEAUX	XVIII
INTRODUCTION	19
Introduction générale	20
1 La régénération osseuse guidée	22
1.1 Historique	22
1.2 Réparation osseuse	24
1.2.1 La phase inflammatoire	25
1.2.2 La phase de réparation	26
1.2.3 Le remodelage osseux	27
1.3 Principe de la régénération osseuse guidée	27
2 Les membranes pour la régénération osseuse guidée	28
2.1 Cahier des charges des membranes pour la ROG	29
2.2 Les membranes non résorbables	31
2.2.1 Les membranes dérivées de polymères synthétiques	31
2.2.2 Les membranes en titane ou alliage de titane	31
2.3 Les membranes résorbables	32
2.3.1 Les membranes d'origine naturelle	32
2.3.1.1 Les membranes autologues	32
2.3.1.2 Les membranes d'origine allogénique	38
2.3.1.3 Les membranes d'origine xénogénique	40
2.3.1.4 Les membranes dérivées de polymères naturels	43
2.3.2 Les membranes d'origine synthétique	45
2.4 Les membranes de troisième génération	47
2.4.1 Les membranes de type Janus	47
2.4.2 Les membranes en alliage métallique à base de magnésium	48
3 Les substituts osseux pour la régénération osseuse guidée	49
3.1 Cahier des charges des substituts osseux pour la ROG	50
3.2 Les substituts osseux d'origine synthétique	52
3.2.1 Les substituts osseux à base de céramiques	52
3.2.1.1 Les phosphates de calcium	52
3.2.1.2 Les matériaux à base de silicium : les bio-verres	54
3.2.1.3 Les sulfates de calcium	54
3.2.1.4 Les carbonates de calcium	55
3.2.2 Les polymères d'origine synthétique	55
3.3 Les substituts osseux d'origine naturelle	58
3.3.1 Les substituts osseux d'origine humaine : L'allogreffe	58
3.3.2 Les substituts osseux d'origine animale	58
3.3.2.1 La xéno greffe	58
3.3.2.2 Les protéines	58
3.3.3 Les polysaccharides	60
3.3.3.1 Les polysaccharides d'origine végétale	60

TABLE DES MATIERES

3.3.3.2	Les polysaccharides dérivés de micro-organismes	61
3.4	Les matériaux composites	64
3.4.1	Les polymères synthétiques et naturels	64
3.4.2	Les polymères naturels combinés à des phosphates de calcium	65
3.4.3	Les polymères synthétiques combinés à des phosphates de calcium	65
3.4.4	Incorporation d'ions métalliques	65
3.4.5	Les substituts osseux à base de facteurs de croissance	67
3.4.6	Les substituts osseux à base de produits cellulaires	70
3.5	Article n°1 : Revue systématique de la littérature	71
OBJECTIFS		94
RÉSULTATS		97
4	<i>Développement d'une membrane à base de pullulane/dextrane pour la régénération osseuse guidée</i>	98
4.1	Introduction	98
4.2	Article n°2	99
4.3.	Conclusion	117
5	<i>Mise au point d'un modèle pré-clinique de défaut maxillaire chez le rat pour tester l'efficacité sur la régénération osseuse de la membrane en pullulane/dextrane/HA</i>	120
5.1	Introduction	120
5.2	Article n°3	121
5.3	Conclusion	156
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		158
COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS		163
Publications		164
Communications orales (congrès nationaux)		164
Communications affichées (congrès internationaux et nationaux)		165
BIBLIOGRAPHIE		167

ABRÉVIATIONS

A

ANG-II angiotensin-II

ADSCs adipose derived stem cells

B

BMP bone morphogenetic protein

BMU basic multicellular unit

C

CGRP calcitonin gene-related peptide receptor

F

FDA Food and Drug Administration

FGF fibroblast growth factor

FS fibroïne de soie

G

GAGs glycoaminoglycanes

H

HA hydroxyapatite

HIF hypoxia growth factor

I

IL-1 interleukine-1

iPS induced pluripotent stem cells

ITO ingénierie tissulaire osseuse

M

MAH membrane amniotique humaine

MCH membrane chorionique humaine

MEC matrice extracellulaire

MicroCT micro-computed tomography

MI membrane induite

MSCs mesenchymal stem cells

N

NGF nerve growth factor

O

OPN ostéoprotégrine

P

PCL poly- ϵ -caprolactone

PEG polyéthylène glycol

PDGF platelet derived growth factor

PDSCs periosteum derived stem cells

ABRÉVIATIONS

PGA polyglycolic acid
PGC proliferator-activated receptor gamma coactivator
PLA polylactic acid
PLGA (polylactic-coglycolic) acid
PMMA poly(methyl methacrylate)
PRF plasma-rich fibrin
PRISMA Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
PTFE polytetrafluoroéthylène

R

RANK receptor activator of nuclear κ B
ROG régénération osseuse guidée
RTG régénération tissulaire guidée

S

SIS small intestinal submucosa

T

TCP tricalcium phosphate
TNF transforming growth factor

V

VEGF vascular endothelial growth factor

W

WH whitlockite

- Figure 1 : Historique de la RTG et de la ROG.*
- Figure 2 : Principe de la régénération tissulaire guidée.*
- Figure 3 : Implication des différents types cellulaires lors du processus de réparation osseuse.*
- Figure 4 : Chronologie de la cicatrisation osseuse.*
- Figure 5 : Principe de la régénération osseuse guidée.*
- Figure 6 : Les différentes générations de membranes pour la régénération osseuse guidée.*
- Figure 7 : Exemple d'une membrane en maille de titane implantée en association avec un matériau de comblement dans le cadre d'une augmentation alvéolaire verticale.*
- Figure 8 : Structure du périoste.*
- Figure 9 : Les différentes phases obtenues suite à la centrifugation du sang du patient.*
- Figure 10 : Déroulement de la technique de Masquelet en deux temps.*
- Figure 11 : Coupe histologique d'une membrane induite colorée au rouge Sirius vue en lumière blanche ou en lumière polarisée.*
- Figure 12 : Expression des différents facteurs de croissance sécrétés lors de la formation de la MI.*
- Figure 13 : Composition des membranes amniotique et chorionique humaines.*
- Figure 14 : Morphologie de la membrane issue de la SIS.*
- Figure 15 : Différentes membranes commerciales à base de collagène.*
- Figure 16 : Morphologie de la membrane asymétrique en chitosane.*
- Figure 17 : Coloration H&E d'un défaut de calvaria chez le rat.*
- Figure 18 : Représentation schématique du fonctionnement de la membrane en PVDF pour la cicatrisation des tissus gingivaux et osseux.*
- Figure 19 : Utilisation d'une membrane en Mg comme bouclier dans le cadre de la reconstruction d'os alvéolaire.*
- Figure 20 : Les différents types de substituts osseux pour la régénération osseuse.*
- Figure 21 : Les différents critères requis pour le développement de substituts osseux pour la régénération osseuse guidée.*
- Figure 22 : Mécanisme de la formation d'une couche d'hydroxyapatite à la surface d'un bio-verre.*
- Figure 23 : Structure chimique de l'acide polyglycolique (PGA).*
- Figure 24: Structure de l'acide polylactique (PLA).*
- Figure 25 : Structure de l'acide poly(glycolique-co-lactique) (PLGA).*
- Figure 26 : Structure du poly-(ε-caprolactone) (PCL).*
- Figure 27 : Structure linéaire du polyéthylène glycol (PEG).*
- Figure 28 : Implication de certains ions métalliques dans la régénération osseuse.*
- Figure 29 : Activité des différentes molécules de signalisation lors de la réparation osseuse.*
- Figure 30 : Quelques voies de signalisation impliquant certains facteurs de croissance dans la formation osseuse*
- Figure 31 : Mécanisme d'action de HIF dans la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques*
- Figure 32 : Structure du collagène de type I.*
- Figure 33 : Structure de la gélatine*
- Figure 34 : Représentation schématique des fibroïnes de soie.*
- Figure 35 : Structure de la cellulose.*
- Figure 36 : Exemple de la structure d'un sel d'alginate, cas de l'alginate de sodium.*
- Figure 37 : Structure du chitosane.*
- Figure 38 : Structure du dextrane.*
- Figure 39 : Structure du pullulane.*

Figure 40 : Evaluation des propriétés mécaniques (modules d'Young) des différentes formulations par nano-indentation.

Figure 41 : Exemple d'un défaut où la membrane ne fait plus face au défaut.

Figure 42 : Exemples de différents profils de relargages de molécules bioactives combinés.

Tableau I : Avantages et inconvénients des membranes non-résorbables.

Tableau II : Avantages et inconvénients des membranes autologues, d'origine allogénique.

Tableau III : Avantages et inconvénients des membranes issues de polymères naturels.

Tableau IV : Avantages et inconvénients des membranes issues de polymères synthétiques.

Tableau V : Les différentes propriétés de quelques substitus osseux et leurs limites.

Tableau VI : Quelques exemples de facteurs de croissance utilisés en ITO.

INTRODUCTION

Introduction générale

Les pertes de substances osseuses en chirurgie orale et maxillo-faciale ont différentes étiologies. Elles peuvent, en effet, être dues à un traumatisme (accident de la route, faits de guerre...), une pathologie tumorale (bénigne ou maligne) ou infectieuse (complication d'une infection d'origine dentaire ou parodontale...), une anomalie congénitale (fente faciale) ou avoir une origine iatrogène (ostéoradionécrose, ostéochimionécrose) [1]. Ces pertes peuvent entraîner des complications fonctionnelles (troubles de l'alimentation), morphologiques ou psychologiques impactant la vie du patient.

Afin de reconstruire la zone lésée, le chirurgien dispose de différentes techniques d'augmentation pour régénérer ces pertes de substance osseuse. L'une des techniques les plus utilisées est la régénération osseuse guidée pour l'augmentation (horizontale et/ou verticale) et la préservation de l'os alvéolaire. Elle est pratiquée dans plus de 40% des cas [2]. Cette technique repose sur l'utilisation de membranes jouant le rôle de barrière afin d'isoler le défaut osseux des tissus environnants. Ces membranes peuvent être utilisées en association ou non avec des substituts osseux.

Différents types de membranes ont été développées et utilisées ces dernières années en pratique clinique. Les membranes non-résorbables (synthétiques ou en métal) furent les premières à être implantées. Toutefois leur risque d'exposition élevée et le besoin d'un second temps chirurgical pour les retirer a limité leur utilisation. Afin de s'affranchir de cette seconde étape, des membranes résorbables ont été élaborées. Ces membranes dérivent fréquemment de produits d'origine animale (*e.g.*, collagène). Des alternatives sont actuellement recherchées pour développer de nouvelles membranes à partir de substances naturelles pour limiter l'utilisation de produits d'origine animale [3].

L'hypothèse de ces travaux reposait sur l'impact de l'utilisation conjointe de deux polysaccharides, le pullulane et le dextrane, sur la régénération osseuse dans des modèles de défauts osseux critiques et non-critiques.

Les travaux constituant cette thèse ont porté sur le développement de membranes à base de polysaccharides et leur évaluation pour la régénération osseuse guidée.

Ce manuscrit est divisé en quatre parties :

- La **première partie** propose une présentation générale des principes de la régénération osseuse guidée. Les différents matériaux utilisés dans cette technique ont été répertoriés en s'intéressant dans un premier temps aux membranes puis aux substituts osseux. Un focus sur l'utilisation de matériaux à base de pullulane et/ou de dextrane, qui sont les deux

polysaccharides utilisés ici pour le développement d'une membrane, sera présentée sous la forme d'une **revue systématique de la littérature**.

- La **seconde partie** rapporte les objectifs généraux de cette thèse.
- La **troisième partie** présente les différents résultats obtenus durant cette thèse sous forme de publications scientifiques : un article (publié) et un projet d'article. Le premier article s'intéresse au développement et à la comparaison de deux membranes naturelles pour la régénération osseuse guidée. Deux formulations à base de polysaccharides ont été élaborées par l'entreprise SILTISS, l'une composée uniquement du mélange polysaccharidique (notée Mb) et l'autre composée du mélange polysaccharidique associé à des particules d'hydroxyapatite (notée Mb + HA). Ces deux membranes ont ensuite été comparées à une membrane commerciale (Bio-Gide®) pour une évaluation *in vitro* ainsi que des études pré-cliniques en site ectopique et orthotopique chez le rat. Le second article (projet d'article) présente le développement d'un nouveau modèle pré-clinique pour tester des biomatériaux destinés à la régénération osseuse en chirurgie orale. Un défaut alvéolaire de taille critique a été développé dans le maxillaire de rat dans lequel la membrane polysaccharidique précédemment sélectionnée a été implantée et comparée à une membrane couramment utilisée en pratique clinique.
- La **quatrième partie** de ce manuscrit conclut les travaux menés et présente une perspective des travaux envisagés.

Ces travaux ont été financés en partie par la région Nouvelle-Aquitaine ainsi que l'entreprise SILTISS. Ces travaux ont également bénéficié d'un financement par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR-20-CE18-0034 GlycoMb).

1 La régénération osseuse guidée

1.1 Historique

Le principe de la régénération osseuse guidée (ROG) repose sur les fondements de la régénération tissulaire guidée (RTG). Pour comprendre l'évolution de ce principe, il faut tout d'abord retracer l'historique des différentes expérimentations menées.

Les premières études sur la ROG ont été menées par Murray *et al.* en 1957 (**Figure 1**) [4]. Une cage en plastique est apposée sur un défaut dans l'os iliaque de chien afin d'isoler la lésion des tissus épithélio-conjonctifs. De l'os néoformé est observé au sein de la cage, suggérant ainsi qu'en isolant mécaniquement le défaut, l'infiltration cellulaire des tissus mous (qui prolifèrent plus rapidement que les cellules ostéoprogénitrices) serait empêchée, favorisant alors la cicatrisation du tissu osseux. D'autres études pré-cliniques ont été réalisées pour confirmer cette découverte. En 1960, Linghorne implante des tubes en polyéthylène dans un défaut segmentaire de fibula (15 mm) chez le chien [5]. La régénération aux extrémités de l'os est observée dès le 27^{ème} jour post-opératoire. Melcher et Dreyer ont, par la suite, testé des membranes en acétate de cellulose pour recouvrir un défaut diaphysaire fémoral (3 mm) bilatéral chez le rat [6]. Ils ont montré que l'apposition d'une membrane sur le défaut permettait la formation et le maintien du nouveau tissu osseux et ce, jusqu'à 18 mois post-opération. En 1976, Melcher décrit le principe de la RTG en parodontologie. Ce principe repose sur le principe de compétition cellulaire [7]. Lors de la cicatrisation parodontale, quatre compartiments distincts vont entrer en compétition pour régénérer l'attache : (i) la gencive, (ii) le ligament parodontal, (iii) le ciment et (iv) l'os alvéolaire. Afin de préserver l'intégrité du parodonte et d'empêcher l'effondrement de la gencive dans le défaut, une membrane est appliquée comme barrière pour permettre la colonisation et la prolifération du tissu propice et empêcher l'infiltration de types cellulaires indésirables (**Figure 2**). Des études pré-cliniques de lésions parodontales réalisées chez le singe ont permis d'observer la régénération du parodonte par les cellules provenant du ligament parodontal lorsqu'une membrane synthétique (à base de cellulose [8,9] ou de polytetrafluoréthylène expansée e-PTFE [9]) était utilisée pour isoler la surface radiculaire du tissu gingival.

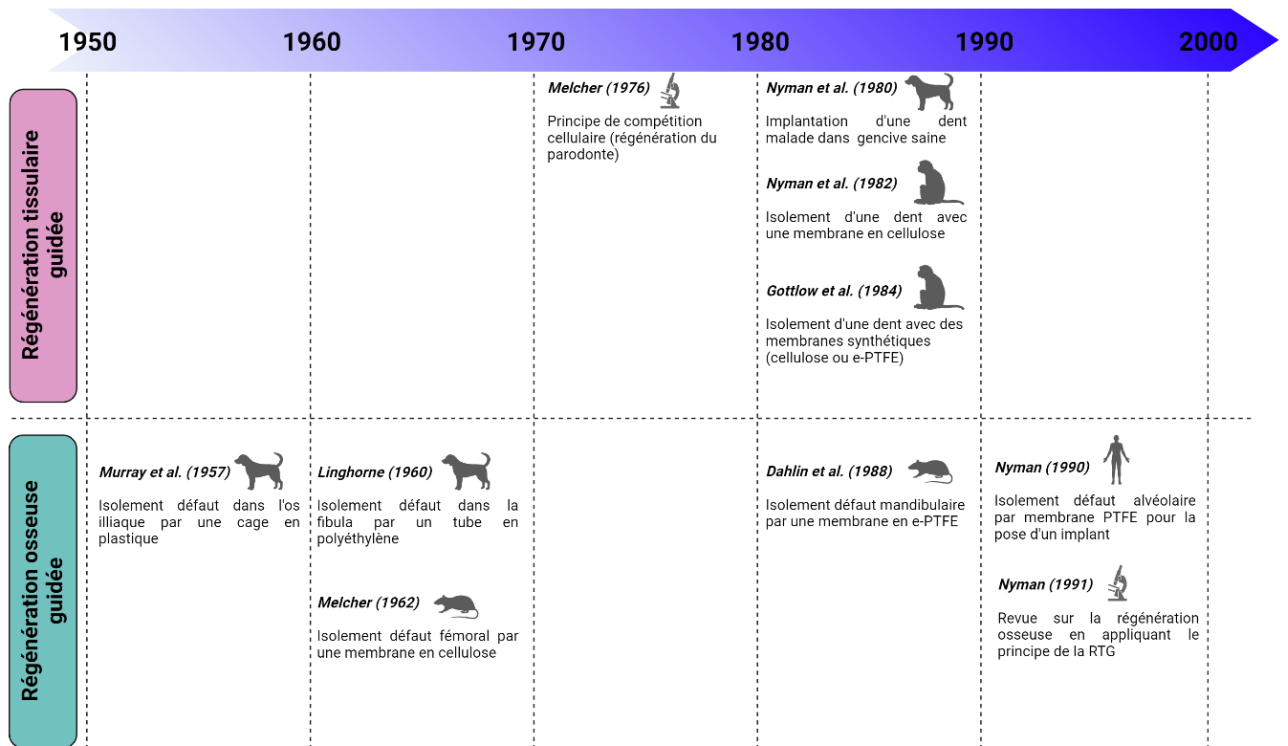


Figure 1 : Historique de la RTG et de la ROG

Plus tard, en 1988, Dahlin *et al.* ont étudié la régénération d'os alvéolaire dans un défaut placé dans l'angle mandibulaire (5 mm) chez le rat [10]. Le défaut est soit laissé vide, soit recouvert d'une membrane en e-PTFE (dans la partie buccale et linguale). Une régénération complète de l'os est observée pour les défauts recouverts de membrane dès 6 semaines après la chirurgie. La régénération des défauts contrôles (condition vide) est incomplète et le défaut est majoritairement comblé avec du tissu fibreux jusqu'à la fin de l'expérimentation (22 semaines) [10,11]. Des études cliniques démontrant l'intérêt de membranes résorbables et non-résorbables pour la ROG chez l'humain ont par la suite étaient menées [12–14].

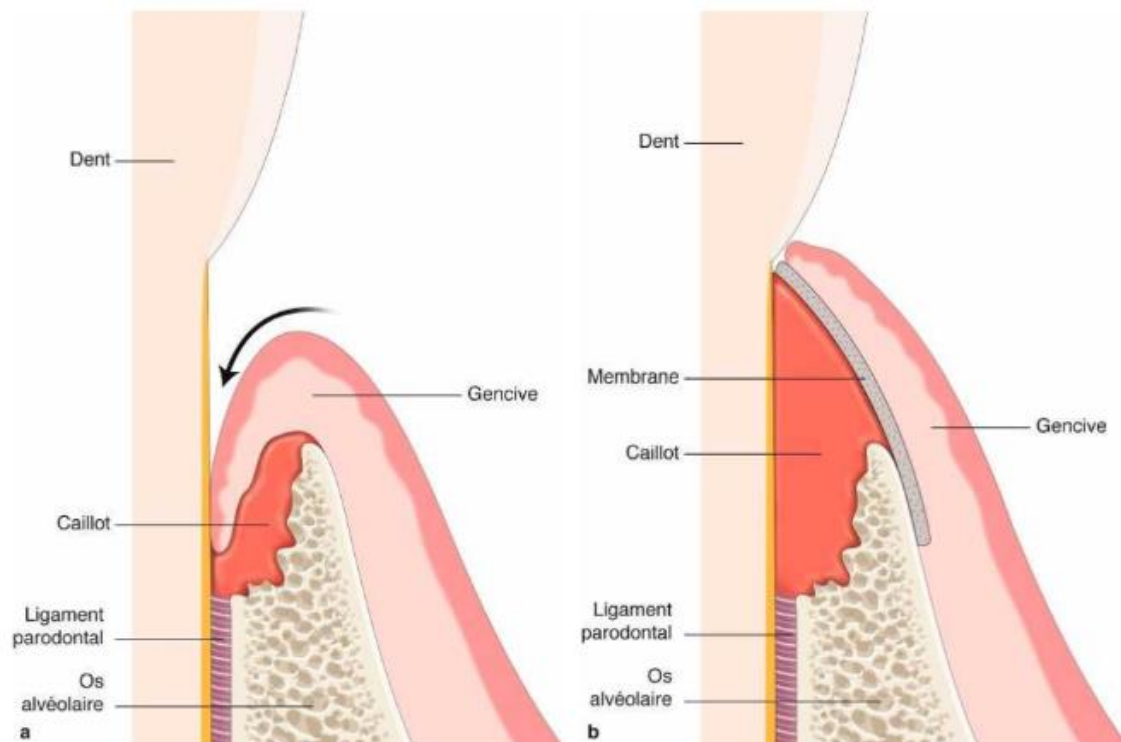


Figure 2 : Principe de la régénération tissulaire guidée [15].

1.2 Réparation osseuse

Lors d'une lésion, la reconstruction du tissu osseux au niveau du site lésé entraîne une réaction en chaîne de trois grandes phases : 1) une phase d'inflammation, suivie 2) d'une phase de réparation pour terminer 3) par une phase de remodelage osseux. Ces processus impliquent divers types cellulaires (des cellules progénitrices, des cellules inflammatoires, des cellules endothéliales et hématopoïétiques) qui vont réguler la réparation osseuse par la stimulation de facteurs chimiques, physiques ou mécaniques environnants (**Figure 3**) [16,17].

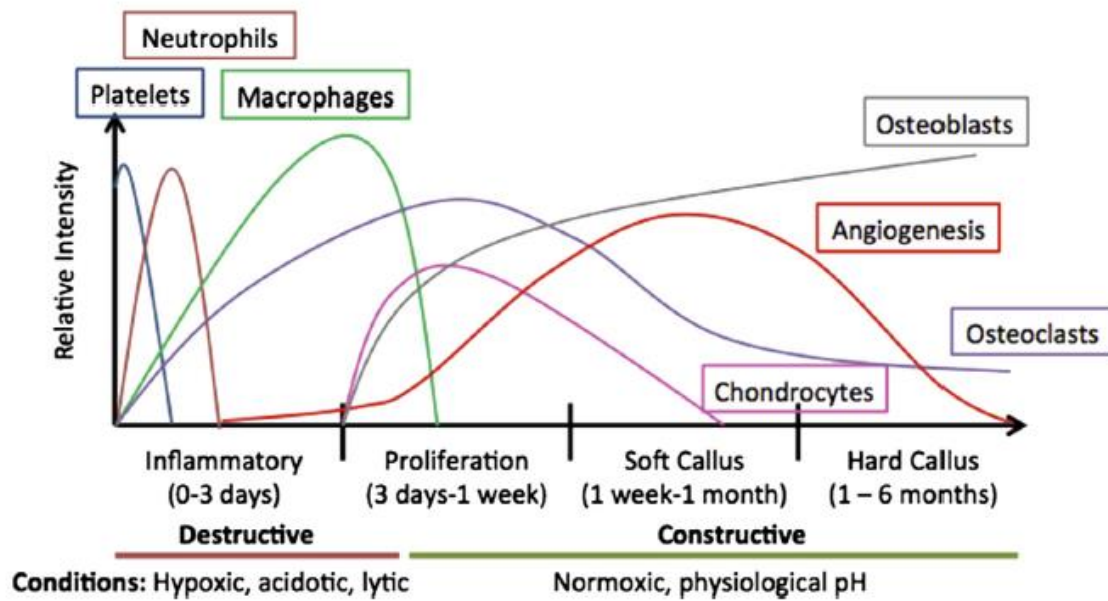


Figure 3 : Implication des différents types cellulaires lors du processus de réparation osseuse [16].

1.2.1 La phase inflammatoire

Suite à une lésion au niveau de l'os, un hématome constitué de plaquettes, de macrophages, de fibrine, de facteurs de croissance (TNF- α , TNF- β , VEGF) et de cytokines (IL-1, IL-6) se forme [16,18]. Cet hématome riche en fibrine constitue le caillot sanguin qui assurera l'hémostase (**Figure 4**) [19]. Cette phase inflammatoire, qualifiée de phase destructive, dure approximativement 3 jours et induit localement de l'hypoxie. Cet environnement favorise ainsi la prolifération de nouveaux vaisseaux sanguins qui permettront le recrutement de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) depuis le périoste et l'endoste par les macrophages [18]. Ces MSCs se différencieront par la suite en chondrocytes et en ostéoblastes pour initier le processus de réparation.

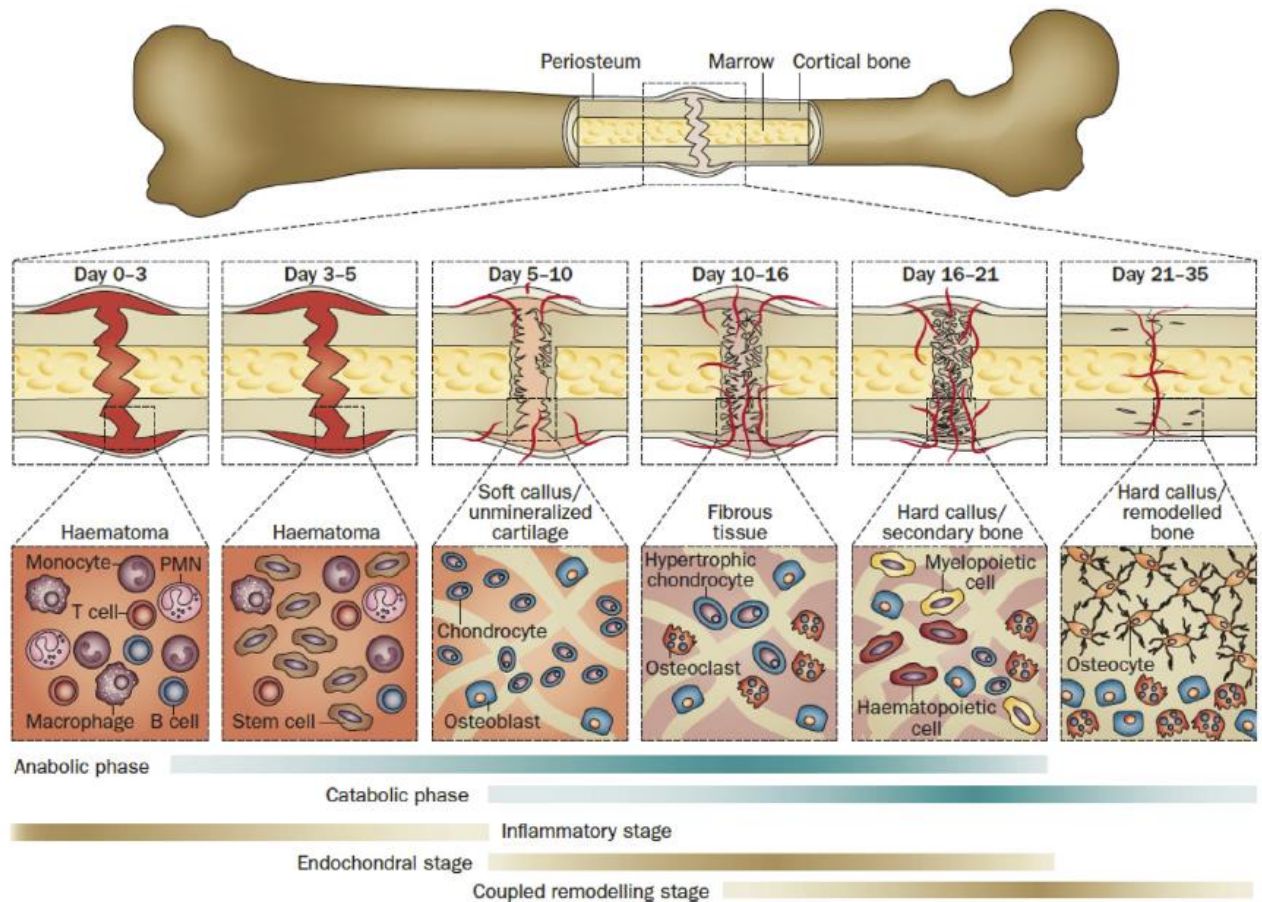


Figure 4 : Chronologie de la cicatrisation osseuse. Les temps indiqués correspondent à la cicatrisation d'un défaut fémoral chez la souris [20].

1.2.2 La phase de réparation

Lors de la phase de réparation (phase dite constructive), la matrice provisoire de fibrine (caillot sanguin) est remplacée progressivement par un tissu de granulation sous l'action des macrophages pour donner une structure plus organisée appelée « cal » (environ 1 semaine après la phase inflammatoire [21]). Ce tissu mou se vascularise et se calcifie suivant deux processus : (i) l'ossification endochondrale ou (ii) l'ossification intramembranaire [22].

L'ossification endochondrale se définit par la formation d'un « cal cartilagineux » issu de la sécrétion de fibres de collagène par les chondrocytes. Ce tissu cartilagineux se vascularise et se minéralise progressivement par la différenciation de chondrocytes en hyperchondrocytes, laissant place à un tissu dur lamellaire organisé.

L'ossification intramembranaire, à l'inverse, évolue directement vers un « cal » osseux dur formé à partir des fibres de collagène sans passage par une phase cartilagineuse.

1.2.3 Le remodelage osseux

Lors du remodelage osseux, le tissu ostéoïde nouvellement synthétisé est remodelé pour donner l'os mature minéralisé. Ce processus est assuré par le rapport entre l'activité des ostéoblastes (formation) et l'activité des ostéoclastes (résorption) au sein d'une unité multicellulaire basique (BMU). Ce sont les ostéocytes, encapsulés dans la matrice extracellulaire (MEC), qui vont initier ce remodelage suite à un stimulus mécanique.

1.3 Principe de la régénération osseuse guidée

Le principe de la régénération osseuse guidée (ROG) repose sur la compétition cellulaire entre les cellules issues des tissus épithélio-conjonctifs, qui prolifèrent plus rapidement, et les cellules ostéoprogénitrices, qui croient plus lentement (*Figure 5*). En pratique, le défaut osseux est séparé, à l'aide d'une barrière physique, appelée membrane, des tissus épithélio-conjonctifs environnants [2,23–25]. La face en contact avec la lésion peut servir de structure aux cellules ostéoprogénitrices et ainsi favoriser la cicatrisation. Cette technique est très largement utilisée en chirurgie orale et maxillo-faciale pour l'augmentation (horizontale et/ou verticale) et la préservation de l'os alvéolaire. Elle est pratiquée dans plus de 40% des cas [2].

Afin d'assurer la faisabilité de la ROG, Wang *et al.* ont décrit en 2006, quatre principes biologiques fondamentaux à suivre pour une ROG idéale, connus sous l'acronyme anglais **PASS** [28] :

- (i) « **P**rimary wound closure » (fermeture de première intention) : pour assurer une cicatrisation rapide des berges de la plaie et ainsi créer un environnement stérile pour prévenir toute infection bactérienne ou stress mécanique.
- (ii) « **A**ngiogenesis » (angiogenèse) : la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la lésion permet la formation du caillot sanguin ainsi que la formation d'un tissu granuleux qui se minéralisera et formera le nouveau tissu osseux.
- (iii) « **S**pace maintenance » (maintien du volume à régénérer) : la membrane supporte la croissance du tissu néoformé et empêche les cellules issues des tissus épithélio-conjonctifs d'envahir le défaut osseux.
- (iv) « **S**tability of blood clot » (stabilité du caillot sanguin) : le maintien en place du caillot sanguin permet l'apport de cytokines, de facteurs de croissance et de molécules signales pour assurer l'angiogenèse et ne pas perturber le processus d'ostéogenèse.

La membrane est souvent associée à un matériau de comblement lors de l'utilisation de la ROG en chirurgie orale. Dans la suite de cette introduction, nous décrivons les principales membranes employées en ROG ainsi que les substituts osseux pouvant être associés.

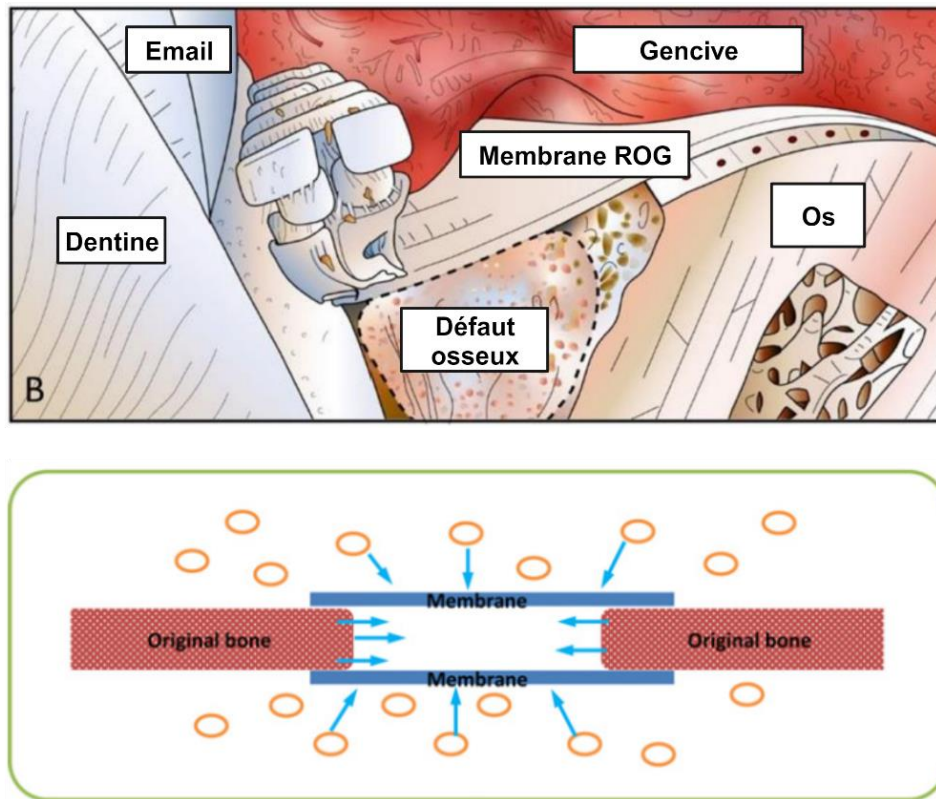


Figure 5 : Principe de la régénération osseuse guidée. Schéma représentatif des différents compartiments en ROG [26]. Une membrane est apposée comme barrière cellulaire au niveau du défaut pour empêcher les cellules environnantes non-ostéogéniques [27].

2 Les membranes pour la régénération osseuse guidée

Les membranes utilisées en ROG sont catégorisées en deux grandes classes : les membranes dites non-résorbables et les membranes résorbables. Différentes générations de membranes ont été élaborées pour répondre au mieux aux critères biologiques précédemment décrits (*Figure 6*) [2,29].

Les membranes non résorbables font partie de la première génération de membranes. Ces membranes agissent comme une barrière physique afin d'isoler le défaut osseux. Elles sont encapsulées par un tissu fibreux au niveau de la lésion. Bien que stables mécaniquement, leur rigidité peut provoquer une irritation des tissus mous sur lesquels elles reposent, entraînant l'exposition de ce type de membrane. De plus, leur rôle passif et la nécessité d'un second temps

chirurgical pour les retirer ont amené les chercheurs à développer une deuxième génération de membranes. Ces dernières, d'origine naturelle ou synthétique, sont résorbables et interagissent avec les tissus environnants (liaisons chimiques à l'interface matériau/tissu hôte) mais elles ne permettent pas de stimuler la synthèse de nouveaux tissus osseux [2,30]. De plus, leur propriété mécanique faible et leur rapide dégradation ne permettent pas d'assurer intégralement le processus de ROG. Ainsi, une nouvelle génération de membranes (*i.e.*, membranes de troisième génération) cherche à stimuler une réponse cellulaire spécifique pour favoriser la formation du tissu osseux tout en assurant la résorption du matériau pour laisser place à l'os nouvellement formé [31]. Ces membranes multifonctions peuvent être associées à des antibiotiques, des céramiques ou des facteurs de croissances afin, non seulement, de jouer un rôle barrière, mais, également, d'être vecteur de la délivrance de molécules bioactives.

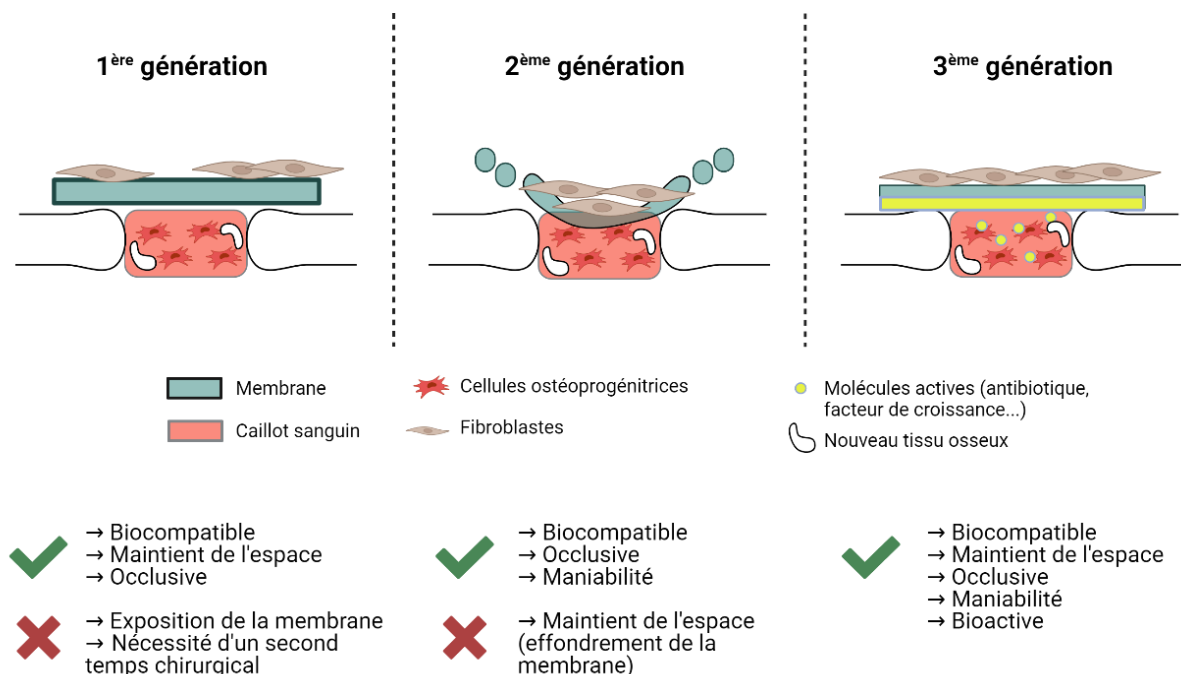


Figure 6 : Les différentes générations de membranes pour la régénération osseuse guidée.

Nous recenserons dans cette partie les différents types de membrane développés au cours de ces dernières années.

2.1 Cahier des charges des membranes pour la ROG

Afin de développer des membranes pour la ROG, un cahier des charges doit être défini [32,33] :

- **Biocompatibilité** : les matériaux implantés doivent être tolérés par le corps humain et doivent limiter la réaction à corps étranger. Leur dégradation progressive ne doit pas engendrer le relargage de substance nocive.
- **Porosité** : elle joue un rôle clé dans le contrôle de l'exclusion des cellules non-ostéogéniques au sein du défaut (membrane occlusive) tout en favorisant l'apport de nutriments et d'oxygène pour maintenir le caillot sanguin en place. Il n'existe pas encore de consensus sur une taille de pores appropriée pour la ROG. Différentes tailles de pores sont retrouvées sur les membranes utilisées allant de la microporosité (5-20 μm) à de la macroporosité (supérieure à 100 μm).
- **Angiogenèse** : Les membranes doivent favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins permettant d'amener les nutriments et l'oxygène aux cellules.
- **Biodégradabilité** : Afin de jouer son rôle barrière, les membranes utilisées en ROG devraient maintenir leur stabilité au moins jusqu'à 24 semaines [34]. Leurs produits de dégradation ne doivent pas impacter le processus de régénération.
- **Propriétés mécaniques** : les membranes doivent pouvoir supporter les forces mécaniques des tissus environnants (compression, tension, cisaillement) pour soutenir la croissance de l'os nouvellement formé (« Space maintenance »).
- **Tolérance à l'exposition** : la contamination bactérienne lors de l'exposition de la membrane peut empêcher la bonne cicatrisation et la néoformation osseuse. La membrane doit donc prévenir toute infection et poursuivre son rôle barrière [35].
- **Activité biologique** : la face de la membrane qui touche le défaut est en étroit contact avec le caillot sanguin et les cellules ostéogéniques. En fonction des composés utilisés (*e.g.*, collagène), les cellules migrent par chimiotactisme et favorisent ainsi la synthèse de tissu osseux.

2.2 Les membranes non résorbables

2.2.1 Les membranes dérivées de polymères synthétiques

Les premières membranes en polytétrafluoroéthylène (PTFE) ont été utilisées en ROG au début des années 1990 [36]. Connu sous le nom de Téflon, le PTFE est un polymère thermoplastique semi-cristallin composé de carbone et de fluor. Les membranes en PTFE sont usuellement conçues selon deux procédés de fabrication. On différencie ainsi les membranes en PTFE expansé (e-PTFE) et les membranes en PTFE à haute densité (d-PTFE).

Les membranes en e-PTFE sont fabriquées par extrusion du PTFE sous forme de monofilaments [27]. Ces fibres peuvent être uni- ou multidirectionnelles. Elles sont composées de deux microstructures distinctes :

- (i) une partie coronaire composée de pores allant de 5 à 30 μm pour faciliter la formation du caillot sanguin et stabiliser la membrane.
- (ii) une partie occlusive avec des pores de 8 μm pour favoriser le transport des nutriments et empêcher l'infiltration cellulaire des tissus mous environnants.

La taille des pores n'étant pas suffisamment petite pour empêcher une infection bactérienne, toute exposition de cette membrane entraîne des complications. Ces membranes sont commercialisées sous le nom Gore-Tex® (W.L. Gore & Associates) [27,37,38].

Pour limiter l'infection bactérienne, des membranes en d-PTFE ont été développées en 1993 (Cystoplast®, Regentex) et ont une taille de pores inférieurs à 0,2 μm .

Les membranes en e-PTFE et d-PTFE peuvent être renforcées avec du titane pour moduler leur forme et ainsi mieux s'adapter au défaut osseux. Un essai clinique randomisé mené sur 23 patients par Ronda *et al.* n'a démontré aucune différence significative entre les membranes e-PTFE et d-PTFE renforcées avec du titane [39].

2.2.2 Les membranes en titane ou alliage de titane

Les membranes en titane (Ti) ou en alliage de titane sont utilisées pour leur biocompatibilité, leur résistance à la corrosion et leur rigidité (**Figure 7**) [27]. En ROG, le titane est utilisé sous forme de mailles pour : (i) sa rigidité pour maintenir en place le caillot sanguin ou le substitut osseux associé et empêcher l'effondrement des tissus mous environnants, (ii) son élasticité pour éviter la compression des tissus mous avoisinants et (iii) sa plasticité qui lui permet d'être façonné pour s'adapter à la forme du défaut.

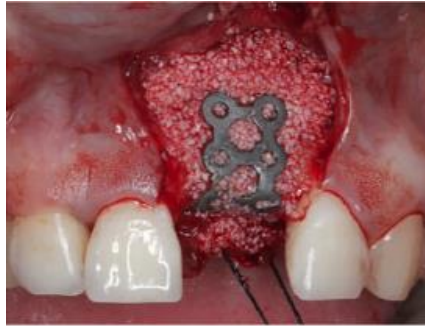


Figure 7 : Exemple d'une membrane en maille de titane implantée en association avec un substitut osseux dans le cadre d'une augmentation alvéolaire verticale [40].

Les avantages et les inconvénients de l'utilisation de membranes non-résorbables sont récapitulés dans le **Tableau I**.

Matériaux		Produits commercialisés	Avantages	Inconvénients
Polymères synthétiques	e-PTFE	Gore-Tex®	Bonne propriété mécanique	Second temps chirurgical
	d-PTFE	Cytoplast TXT-200®	Maintien de l'espace	Risque d'exposition avec infection bactérienne
Métal	Titane	Osteo Mesh TM-300®	Bonne propriété mécanique Maintien de l'espace	Second temps chirurgical Risque d'exposition

Tableau I : Avantages et inconvénients des membranes non-résorbables

2.3 Les membranes résorbables

2.3.1 Les membranes d'origine naturelle

2.3.1.1 Les membranes autologues

Le périoste

Le périoste est une fine membrane qui recouvre les os. Il relie l'os cortical aux muscles, tendons et ligaments par des jonctions appelées fibres de Sharpey [41,42]. Le périoste est constitué de deux couches (**Figure 8**) :

- (i) Une couche fibreuse externe composée de fibroblastes, de collagène de type I et d'élastine et vascularisée par des microvaisseaux.

- (ii) Une couche interne, appelée cambium, composée d'ostéoblastes, de fibroblastes, de cellules ostéoprogénitrices, de cellules souches mésenchymateuses et de péricytes. Cette couche est très vascularisée et elle est innervée.

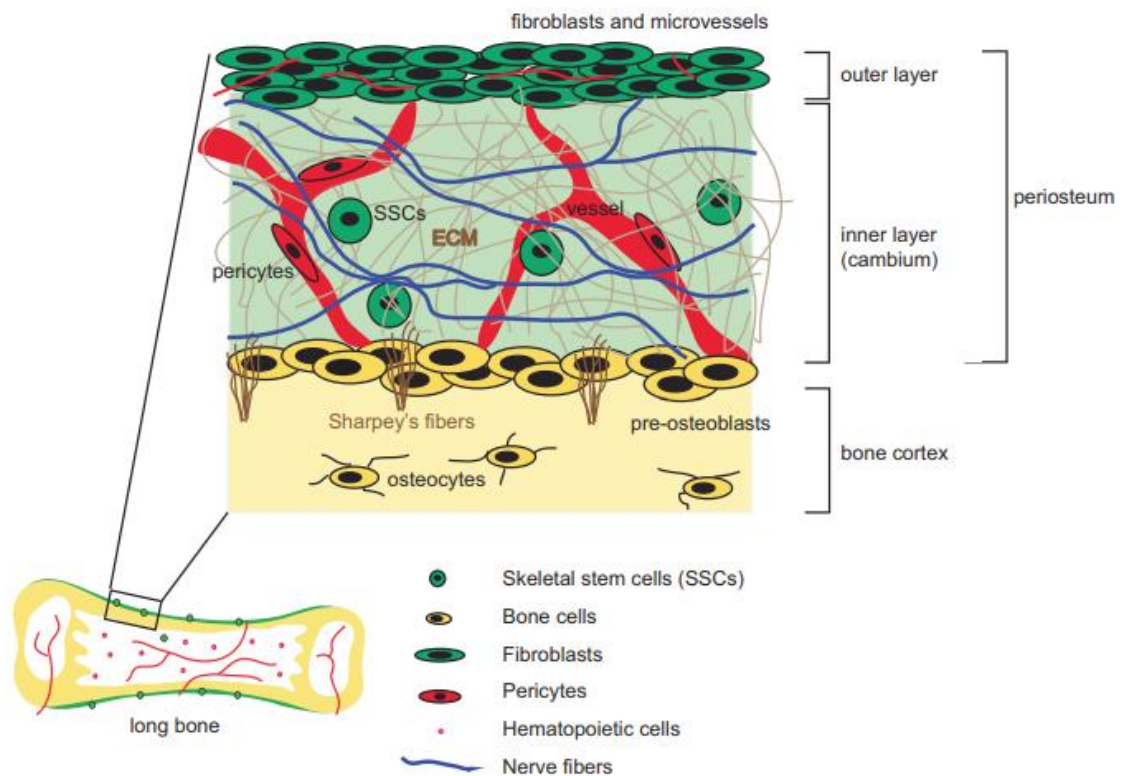


Figure 8 : Structure du périoste [42].

Le périoste participe à la régénération du tissu osseux grâce à son apport de cellules ostéoprogénitrices et par sa vascularisation en fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires [43].

L'utilisation de périoste pour la ROG inclue du périoste libre (non-vascularisé) ou pédiculé (vascularisé) [43,44]. Gallardo-Calero *et al.* ont mis en évidence l'intérêt de l'utilisation de périoste pédiculé dans un défaut segmentaire fémoral chez le rat [45]. Deux conditions ont été analysées soit : (i) en comblant le défaut avec un substitut osseux (allogreffe de rat) seul ou (ii) en comblant le défaut avec un substitut osseux et en le couvrant de périoste pédiculé. Lorsque le défaut était recouvert par la membrane, la revascularisation et le remodelage du site lésé étaient observés comparé au défaut non recouvert. L'utilisation de greffon de périoste en clinique a été étudiée pour la ROG. Ce dernier permet de préserver le défaut de l'infiltration cellulaire des tissus mous ainsi que la vascularisation de l'os néoformé tout en fournissant des cellules ostéoprogénitrices [43].

Avec le développement des techniques de fabrication en ingénierie tissulaire osseuse (ITO), certaines études cherchent à fabriquer de nouvelles membranes double couche pour imiter la

structure du périoste. Li *et al.* ont synthétisé une membrane en polycaprolactone (PCL) par électrospinning combiné ou non avec des nanoparticules de whitlockite (WH) dopée [46]. La surface interne de la membrane est microstructurée par des bandes de nanofibres parallèles espacées de 100 μm . Le relargage de Mg^{2+} ainsi que de Ca^{2+} et de PO_4^{3-} par les particules de whitlockite stimule l'innervation (nerve growth factor NGF), la vascularisation (VEGF) et l'ostéogenèse. Implantée dans un défaut de calvaria chez le rat, la membrane en PCL/WH dopée a montré une meilleure réponse tissulaire pour la régénération osseuse comparée à la membrane en PCL seule.

La membrane autogène issue de plasma riche en fibrine

Le plasma riche en fibrine (PRF) est une membrane autologue extraite à partir du sang du patient. Ce sang est centrifugé pour obtenir trois phases : (i) au niveau du culot, les globules rouges, (ii) à la surface du culot, le PRF et (iii) dans le surnageant, du plasma acellulaire (**Figure 9**) [47]. Le PRF se présente sous la forme d'un caillot de fibrine riche en plaquettes et en leucocytes favorisant ainsi la cicatrisation (fibrine, plaquettes). Il possède également un effet antibactérien (leucocytes). Le PRF est aussi concentré en facteurs de croissance tels que le TGF- β 1 (transforming growth factor-beta1), le PDGF (platelet derived growth factor) ou le VEGF (vascular endothelial growth factor) qui seront progressivement relargués au sein du défaut [47,48]. La centrifugation a un impact sur la qualité des membranes en PRF produites. Il est ainsi possible d'obtenir différents types de membranes à base de PRF concentré en leucocytes (L-PRF), du PRF avancé (A-PRF) ou du PRF par centrifugation horizontale (H-PRF) [49,50].

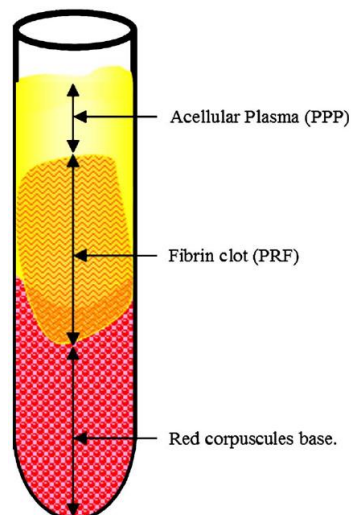


Figure 9 : Les différentes phases obtenues suite à la centrifugation du sang du patient [47].

Une étude pré-clinique chez le rat (défaut critique de calvaria) a évalué le potentiel ostéogénique de différentes membranes en PRF (obtenues par des procédés de centrifugation différents) : L-PRF, A-PRF et H-PRF [50]. Les analyses radiographiques et histologiques ont démontré que la membrane H-PRF favorisait la synthèse de nouveau tissu comparée aux deux autres membranes en PRF ou au défaut laissé vide. L'utilisation d'une membrane pour la ROG reste controversée du fait de sa rapide dégradation (entre 10 et 28 jours) et de sa faible rigidité pour stabiliser le caillot sanguin [49].

La membrane induite ou la technique de Masquelet

La reconstruction de défauts osseux critiques reste un défi en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. En 1986, le Dr Masquelet a élaboré une technique pour la reconstruction de défauts segmentaires des os longs [51]. Suite à cette étude clinique rétrospective, il a défini au début des années 2000, la technique de la membrane induite (MI) ou technique de Masquelet. Cette technique se réalise en deux temps opératoires [52] (*Figure 10*). Une réaction à corps étranger est induite suite à l'introduction d'un ciment chirurgical en poly(méthyl méthacrylate) (PMMA), appelé conformateur ou spacer, pour former la MI. Ce ciment est ensuite substitué par de l'os autologue prélevé au niveau de la crête iliaque. Lors de la première phase de la chirurgie, l'os est stabilisé à l'aide de plaques d'ostéosynthèse et un débridement des tissus mous et osseux est effectué. Le défaut est alors comblé à l'aide du ciment synthétique en PMMA qui peut être associé à des antibiotiques pour limiter les risques d'infection. Une membrane autologue, induite par une réaction à corps étranger, se forme alors (entre 6 à 8 semaines après la chirurgie). Pour la seconde étape de la chirurgie, la MI est délicatement incisée pour retirer le conformateur (PMMA) et le remplacer par de l'os autologue spongieux ou mélangé avec un substitut osseux. Cette technique a plusieurs avantages dont : (i) la stabilisation du défaut, (ii) l'absence d'infiltration cellulaire et (iii) une faible résorption de la greffe préservée par la MI [53].

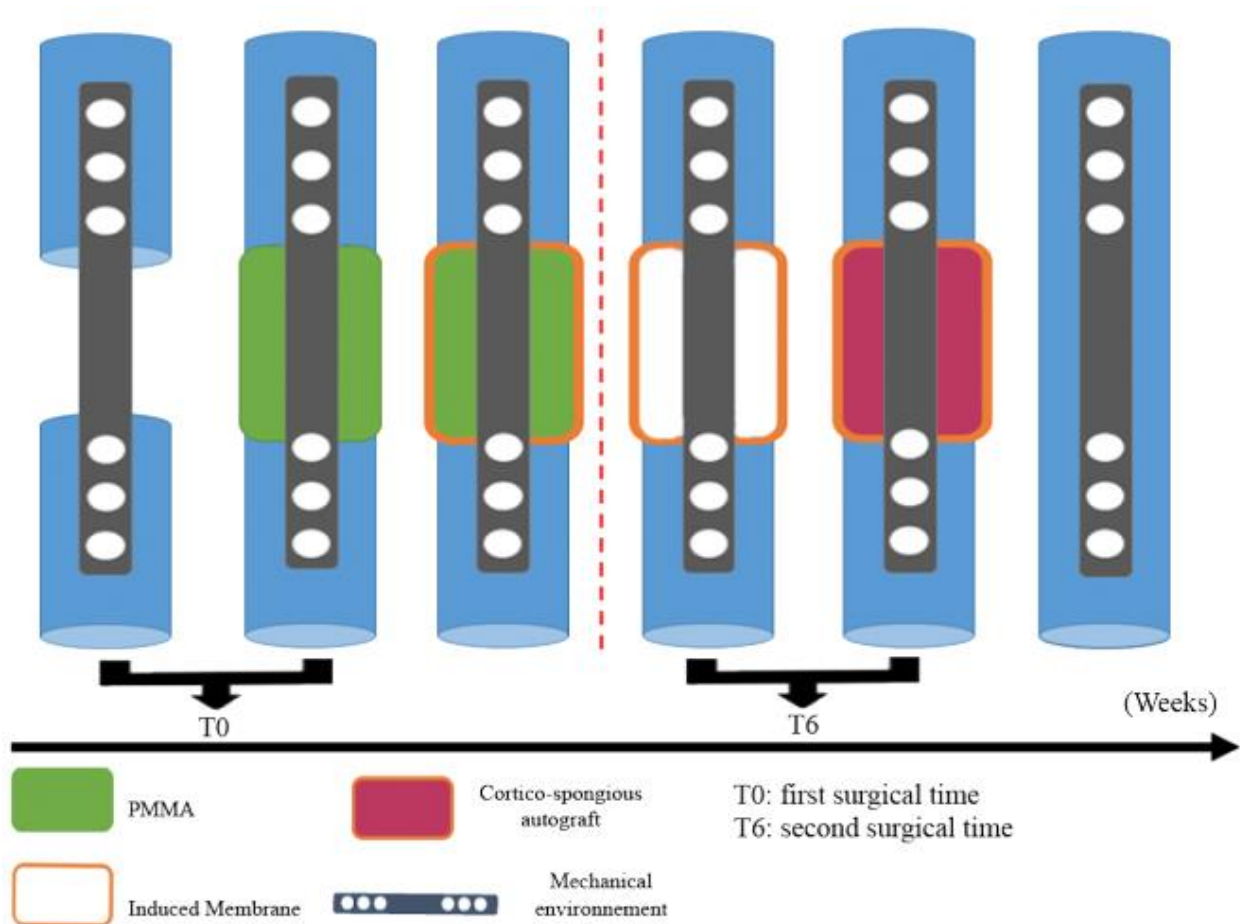


Figure 10 : Déroulement de la technique de Masquelet en deux temps. Induction de la membrane par le ciment en PMMA puis comblement du défaut par de l'autogreffe [53].

La structure de la MI est semblable à celle du périoste [54]. Elle se décompose en deux parties [53] (**Figure 11**) :

- (i) une partie interne (au contact du PMMA) formant un épithélium synovial. Elle est constituée de collagène de type I. Les fibres de collagène s'organisent de façon parallèle au ciment en PMMA.
- (ii) une partie externe (au contact des tissus mous), vascularisée, composée de cellules épithéliales, de fibroblastes et de myofibroblastes. Elle est constituée de collagène de type I et IV.

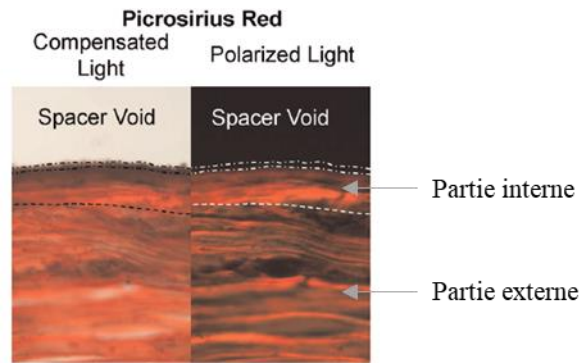


Figure 11 : Coupe histologique d'une membrane induite colorée au rouge Sirius vue en lumière blanche ou en lumière polarisée. Les fibres de collagène de la partie interne s'organisent de façon parallèle au ciment en PMMA, la partie externe a une structure plus désorganisée avec des fibres de collagène lâches [54].

Différents facteurs de croissance sécrétés par la MI ont été répertoriés dans la littérature (TGF- β , bone morphogenetic protein-2 BMP-2, VEGF) (**Figure 12**). Les facteurs ostéogéniques impliqués (TGF- β , BMP-2) vont permettre la prolifération et la différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes. Leur expression dans la MI diffère au cours du temps mais également suivant le site d'induction. Concernant le TGF- β , il reste relativement stable entre 2 et 6 semaines lors de l'induction de la membrane et est retrouvé uniformément dans la MI. Le niveau de BMP-2 est lui maximale à 4 semaines post-opératoire [55]. De plus, il a été montré qu'une MI en sous-cutanée ne favorisait pas l'ostéoinduction lorsqu'elle était associée à un substitut osseux (HA/ β -TCP) révélant une faible concentration en BMP-2 dans la MI [55,56]. Ceci confirmant donc l'implication du microenvironnement osseux dans l'expression de la BMP-2 [53,55]. Les facteurs pro-angiogéniques (VEGF, angiotensin II ANG-II) sont plutôt localisés en périphérie des vaisseaux sanguins, du néo-tissu osseux et de la partie interne de la MI. Ils sont sécrétés dès 2 semaines après l'opération et atteignent une concentration maximale entre 4 et 6 semaines post-chirurgie.

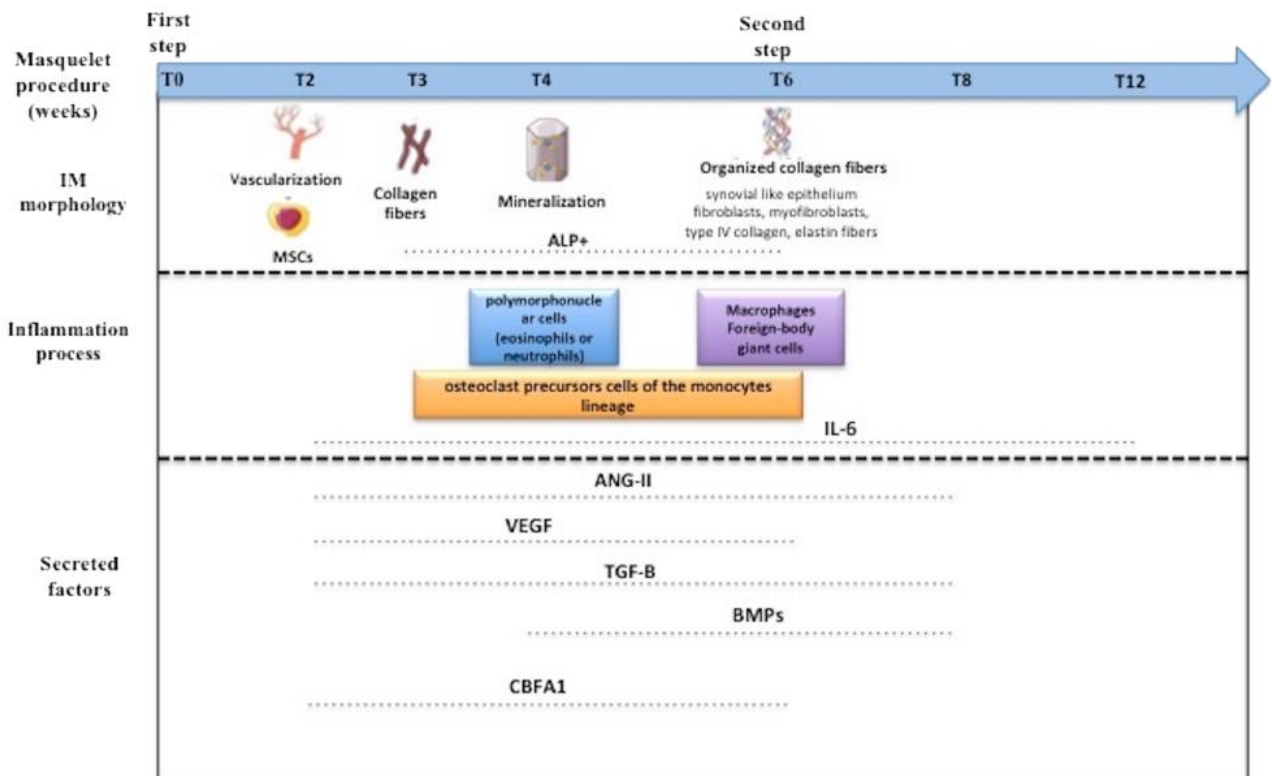


Figure 12 : Expression des différents facteurs de croissance sécrétés lors de la formation de la MI [53].

2.3.1.2 Les membranes d'origine allogénique

Les membranes dérivées du placenta

Le placenta est composé de deux membranes fœtales séparant le fœtus de l'endomètre (**Figure 13**) :

- (i) la membrane intérieure est appelée amnion (MAH), elle n'est pas vascularisée. Elle est constituée de cinq sous-couches comportant : (a) une monocouche épithéliale sécrétant du collagène de type III et IV et des protéines non collagéniques (laminine, nidogène et fibronectine) pour former (b) la membrane basale, (c) une couche compacte (principalement composée de collagène de type I et III), (d) une couche fibroblastique comportant des fibroblastes et des cellules amniotiques mésenchymateuses et (e) une couche spongieuse reliant le chorion [57]. (c), (d) et (e) forment la couche stromale.
- (ii) la membrane supérieure, recouvrant l'amnion, est appelée chorion (MCH). Elle est constituée de trois sous-couches : (a) une couche réticulaire, (b) une membrane

basale et (c) une multicouche épithéliale trophoblastique en contact avec la décidue [58].

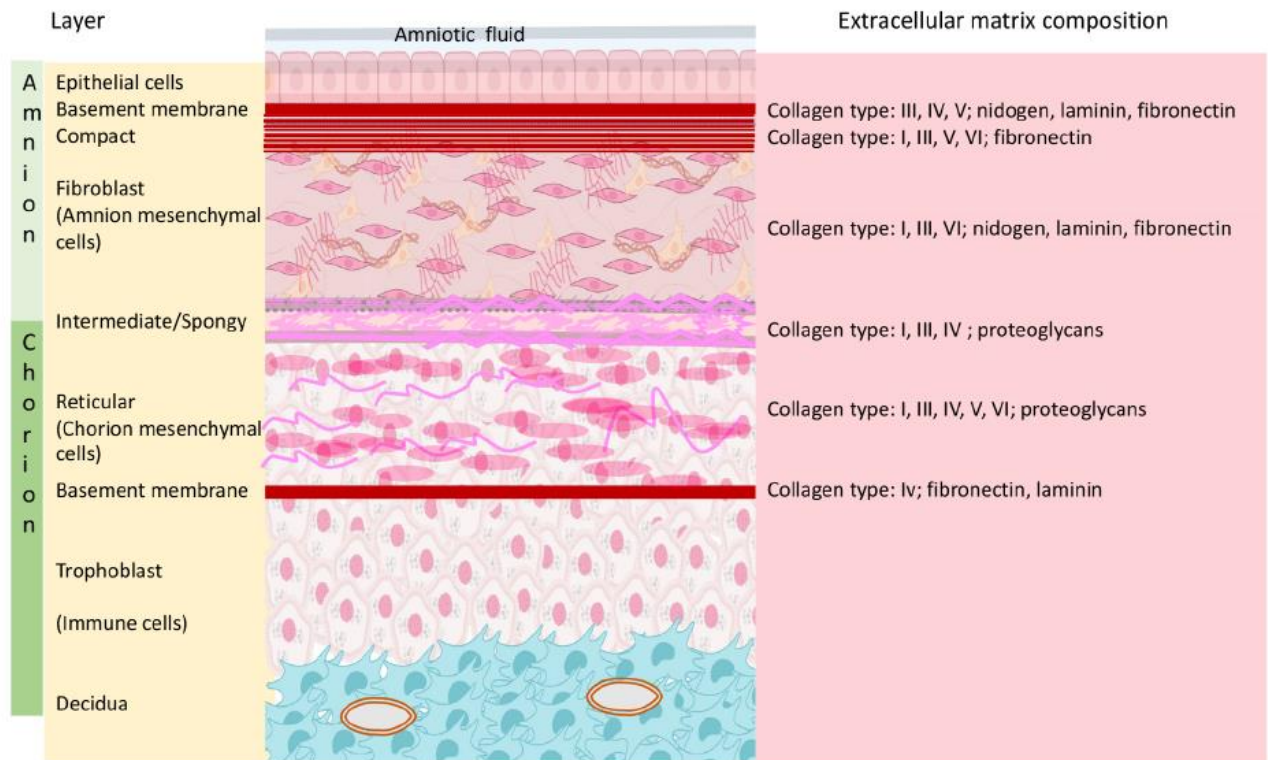


Figure 13 : Composition des membranes amniotique et chorionique humaines [59].

Ces deux membranes ont été utilisées en chirurgie orale seules (MAH ou MCH) ou conjointement (MAH et MCH) pour leur faible immunogénicité, leurs propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes [60]. Une étude pré-clinique menée sur la souris (défaut fémoral diaphysaire) a montré la potentielle utilisation de la MAH lyophilisée et décellularisée en ROG en promouvant la régénération osseuse précoce (à 1 semaine) par rapport au contrôle (défaut laissé vide) [61]. Plusieurs essais cliniques ont démontré l'utilité des membranes MAH et MCH en RTG pour le traitement de défauts parodontaux (récession gingivale et atteintes de la furcation dentaire) [62].

Le derme allogénique

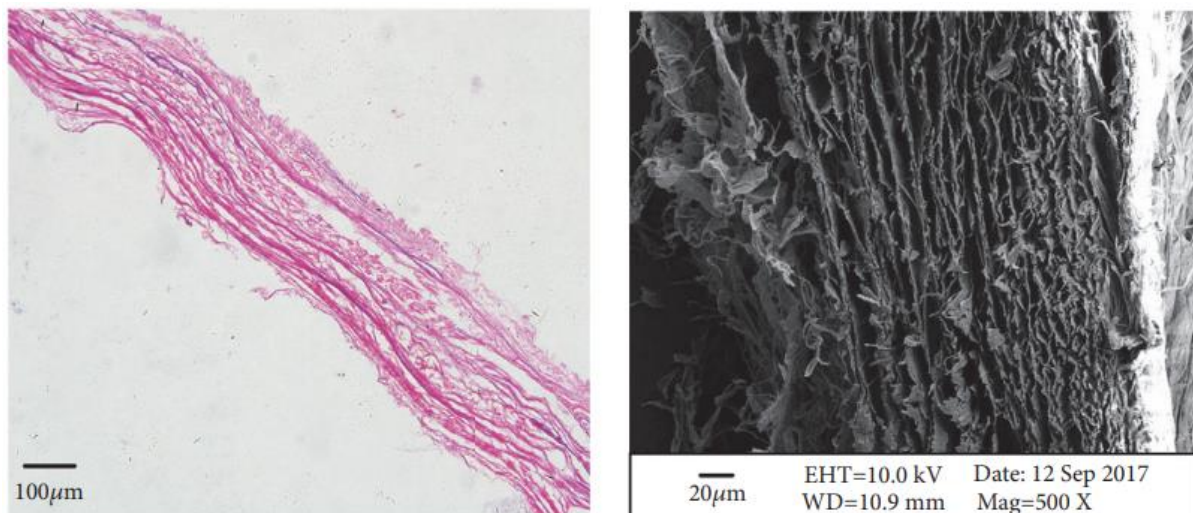
Le derme allogénique, commercialisé sous le nom Alloderm® (Life Cell), est obtenu à partir de derme humain (*e.g.*, cadavre) [63]. Il se présente sous la forme d'une matrice lyophilisée acellulaire principalement constituée de collagène de type I. Initialement commercialisé comme

greffe allogène de peau pour les grands brûlés, il est également utilisé en ROG comme membrane barrière [64,65].

2.3.1.3 Les membranes d'origine xénogénique

La sous-muqueuse de l'intestin grêle (SIS)

Extraite du jéjunum porcine, cette matrice décellularisée est composée de collagène de type I, de glycosaminoglycanes (GAGs), d'élastine, de fibronectine, de FGF (fibroblast growth factor), de VEGF et de TGF (**Figure 14**) [66]. Utilisée en ingénierie tissulaire pour la cicatrisation de différents tissus et organes (vessie, paroi abdominale, tendons, vaisseaux sanguins), la SIS favorise la prolifération et l'adhésion des cellules endothéliales [67,68]. Une étude pré-clinique menée dans un défaut critique mandibulaire chez le lapin a évalué l'utilisation de la membrane SIS en ROG [67]. Le défaut est soit laissé vide ou soit : (i) seulement comblé avec un substitut osseux (Bio-Oss®), (ii) comblé avec un substitut osseux et recouvert par la membrane SIS ou (iii) comblé avec un substitut osseux et recouvert par une membrane collagénique (Bio-Gide®). La régénération osseuse est accélérée lorsque le défaut est recouvert d'une membrane comparée au défaut comblé sans membrane (pas de différence significative entre les deux membranes). La dégradation *in vivo* de ces deux membranes a également été étudiée en implantation sous-cutanée chez le rat. Il a été montré que la membrane SIS était toujours présente 12 semaines après la chirurgie alors que la membrane collagénique était déjà résorbée.



(a) Histological morphology of mSIS

(b) SEM of mSIS cross section, magnification 500x

Figure 14: Morphologie de la membrane issue de la SIS. (A) coupe histologique transversale colorée par H&E, (B) cross-section par microscopie à balayage électronique [67].

Les membranes dérivées du collagène

En clinique, le collagène est une ressource très largement utilisée pour produire des membranes pour la ROG [69]. Il peut être d'origine bovine, porcine ou équine et est extrait à partir de la peau, des tendons ou du cartilage de l'animal [2]. Les collagènes de type I et III sont les plus fréquemment utilisés pour produire des membranes pour la ROG (**Figure 15**) [70]. Il existe tout de même certaines membranes à base de collagène de type IV ou VI [69,71].

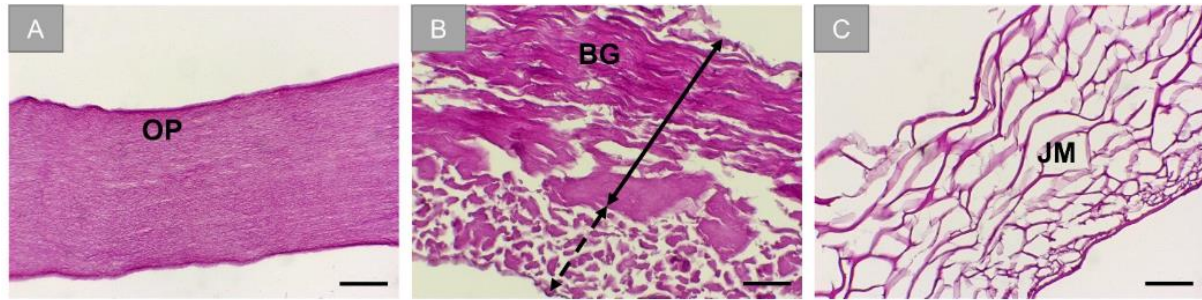


Figure 15 : Différentes membranes commerciales à base de collagène. (A) Ossix® Plus (Datum Dental Biotech) membrane réticulée provenant de tendons de porc (collagène de type I), (B) Bio-Gide® (Geistlich) membrane non réticulée provenant de la peau de porc (collagène de type I et III) et (C) Jason® (botiss biomaterials GmbH) membrane non-réticulée provenant du péricarde porcine [72].

Le collagène possède certaines propriétés intéressantes pour la ROG, telles que : sa biocompatibilité, ses propriétés hémostatiques et chimiotactiques, ou encore sa capacité à favoriser la cicatrisation des tissus conjonctifs environnants (cicatrisation de première intention) [60]. Bien que biodégradable, le temps de résorption de ces membranes varie en fonction du type de collagène utilisé, de l'origine du collagène (animal, site de prélèvement) et de leur éventuelle réticulation. La réticulation du collagène peut être physique par irradiation aux rayons ultra-violet, chimique à l'aide d'agents réticulants (glutaraldéhyde, formaldéhyde, hexaméthylène diisocyanate, diphénylphosphorylazide) ou enzymatique (lysyl oxydase [73]). Plus le taux de réticulation des fibres de collagène sera élevé et plus lente sera la dégradation du matériau. Les membranes actuelles peuvent avoir un temps de dégradation allant de 4 à 38 semaines [71]. Zhu *et al.* ont ainsi comparé la dégradation *in vivo* de deux membranes collagéniques commerciales d'origine différente, Bio-Gide® (d'origine porcine et composée de collagène de type I et III) et Heal-all® (d'origine bovine et principalement composé de collagène de type I) [74]. La membrane Bio-Gide®, implantée en sous-cutanée chez le rat, a montré une dégradation dès 28 jours post-opératoire avec une infiltration de cellules inflammatoires. Des études ont aussi cherché à utiliser ces membranes comme vecteur pour la

délivrance de facteurs de croissance (platelet-derived growth factor PDGF, bone morphogenetic proteins BMPs) pour stimuler l'angiogenèse et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices et favoriser ainsi la formation de nouveaux tissus osseux [70,75,76].

Les avantages et les inconvénients des membranes autologues, allogénique ou xénogénique sont répertoriés dans le **Tableau II**.

	Matériaux	Temps de résorption	Avantages	Inconvénients
AUTOLOGUE	Périoste	-	Apport de cellules ostéoprogénitrices nécessaires à la régénération osseuse	Quantité limitée
	PRF	8-28 jours	Faible coût Apport de facteurs de croissance nécessaires à la régénération osseuse	Résorption rapide
	MI	-	Apport de cellules ostéoprogénitrices et de facteurs de croissance nécessaires à la régénération osseuse	Nécessite un second temps chirurgical
ALLOGÉNIQUE	Alloderm®	28-36 semaines [†]	-	Risque immunogénique
	Placenta (amnion, chorion)	-	Faible coût Nombreuses propriétés biologiques	Maniabilité
XÉNOGÉNIQUE	SIS	≥ 12 semaines [□]	Apport de facteurs de croissance nécessaires à la régénération osseuse	Risque immunogénique
	Collagène		Biocompatible Abondant	Faible propriété mécanique
	Bio-Gide®	24 semaines [†]		Temps de dégradation

Jason®	12-24 semaines†	variable et peu contrôlé Risque immunogénique
Ossix Plus®	16-24 semaines†	

Tableau II : Avantages et inconvénients des membranes autologues, d'origine allogénique ou xénogénique. † données du fabricant, † données d'études pré-cliniques

2.3.1.4 Les membranes dérivées de polymères naturels

Les membranes dérivées de polysaccharides

Le chitosane est un des polysaccharides les plus employés pour le développement de membranes pour la ROG. Les membranes à base de chitosane sont utilisées pour leur biocompatibilité et leur flexibilité [77]. Le chitosane dérive de la chitine, un polysaccharide présent dans la peau des crustacées ou dans la paroi de certains micro-organismes. La résorption de ces membranes est variable et dépend du poids moléculaire du chitosane (lié à son degré de désacétylation) [71]. Le chitosane présente également une faible immunogénicité et possède des propriétés antibactériennes. Il a été montré qu'il promouvait la prolifération et l'adhésion cellulaire et qu'il pouvait stimuler la formation de nouvel os [2,78]. Yang *et al.* ont développé une membrane asymétrique en chitosane pour former une structure bicouche avec une face poreuse (éponge de chitosane) et une face lisse (membrane de chitosane) (**Figure 16**) [79]. Implantée dans un défaut critique de calvaria (5 mm) chez le rat, la membrane en chitosane a montré une régénération osseuse comparable à celle d'une membrane collagénique commerciale (Bio-Gide®). Ces membranes ne sont pour le moment qu'au stade pré-clinique, il n'y a pas encore eu d'étude chez l'homme.

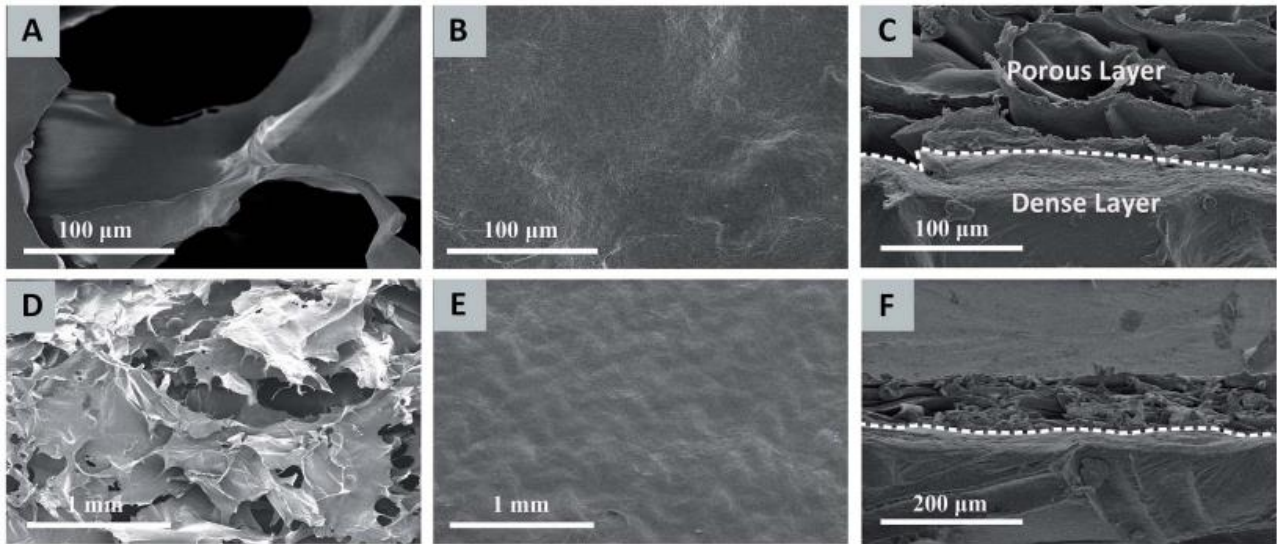


Figure 16 : Morphologie de la membrane asymétrique en chitosane. (A, D) éponge de chitosane, (B, E) membrane compacte de chitosane, (C, F) assemblage de l'éponge et de la membrane [79].

D'autres polysaccharides comme le pullulane ou le dextrane peuvent être utilisés pour élaborer des membranes ROG. Une seule étude menée par Miyahara *et al.* a rapporté l'utilisation de pullulane pour le développement d'une membrane ROG [80]. L'utilisation du pullulane et du dextrane en ingénierie tissulaire osseuse a été étudiée dans une revue systématique de la littérature intitulée « **Recent advances of pullulan and/or dextran-based material for bone tissue engineering strategies in preclinical studies : a systematic review** ». Il est possible de la consulter à la section 3.5. de cette thèse.

Les membranes dérivées de la fibroïne de soie

Les membranes en fibroïne de soie (FS) sont considérées comme de potentiels candidats pour la ROG car elles sont biocompatibles, biodégradables, perméables à l'oxygène et possèdent de bonnes propriétés mécaniques [2,81]. Toutefois, elles sont cassantes lorsqu'elles s'assèchent ce qui peut compliquer leur manipulation. Leurs sites actifs permettent l'ancrage de facteurs de croissance et de cellules souches favorisant ainsi la régénération osseuse et la différenciation cellulaire [82]. En site orthotopique, l'implantation d'une membrane FS dans un défaut de calvaria chez le rat a montré une régénération osseuse supérieure comparée à une membrane collagénique (Bio-Gide®) par analyse radiographique ($p < 0.05$) [83]. L'intégrité de la membrane FS était toujours perceptible même après 12 semaines d'implantation tandis que la membrane collagénique était totalement résorbée (**Figure 17**). D'autres études menées sur la

dégradation *in vivo* de matériaux en FS ont montré un temps de résorption pouvant aller jusqu'à 1 an [84].

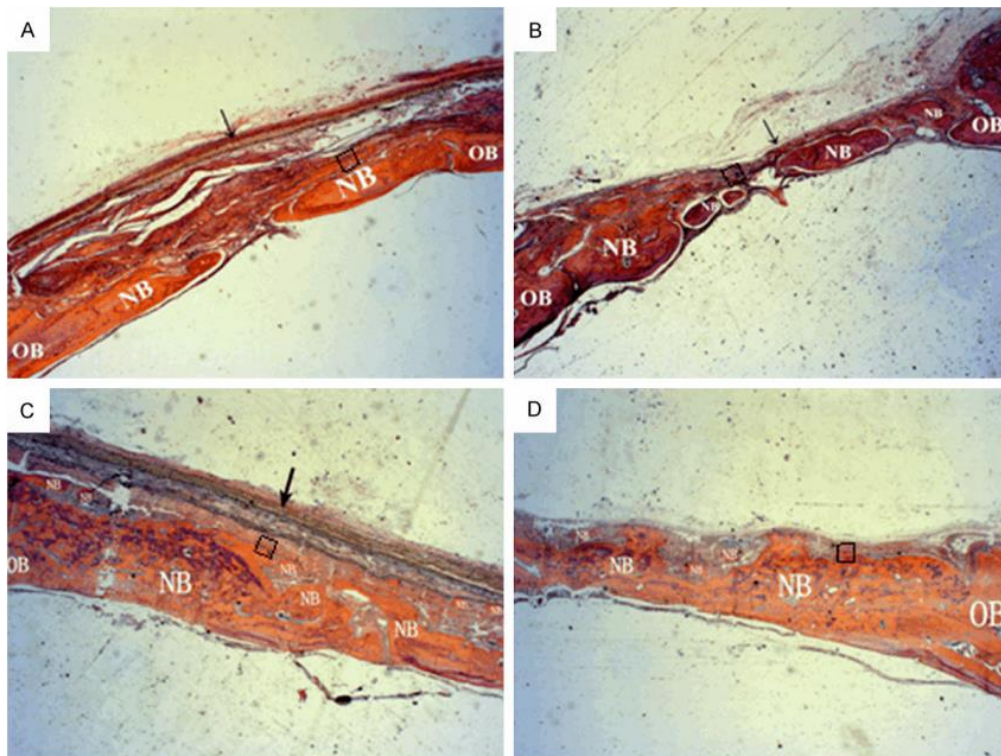


Figure 17 : Coloration H&E d'un défaut de calvaria chez le rat. Implantation de la membrane SF à 4 (A) et 12 (C) semaines post-opératoires ; implantation de la membrane collagénique à 4 (B) et 12 (D) semaines post-opératoires. La flèche représente la membrane résiduelle, NB nouvel os, OB tissu sain [83].

Les avantages et les inconvénients des membranes résorbables en polymères naturels sont répertoriés dans le **Tableau III**.

Polymères naturels	Produits commercialisés	Temps de résorption	Avantages	Inconvénients
Chitosane	-	16-20 semaines [▫]	Biocompatible Prolifération et adhésion cellulaire	Coûteux
Fibroïne de soie	-	8-54 semaines [▫]	Bonne propriété mécanique	Cassante

Tableau III : Avantages et inconvénients des membranes issues de polymères naturels.

▫ données d'études pré-cliniques

2.3.2 Les membranes d'origine synthétique

Les membranes issues de polymères synthétiques permettent de moduler leurs propriétés mécaniques, leur porosité ou leur dégradabilité par voie chimique [69]. La plupart des membranes actuellement commercialisées sont dérivées de polyesters aliphatiques tels que l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA) ou le polycaprolactone (PCL) [2,71,85]. La membrane Guidor®, composée de PLA et d'un ester d'acide citrique (utilisé comme plastifiant), fut l'une des premières générations de membranes alloplastiques commercialisées. Elle est constituée de deux membranes distinctes reliées par un mainteneur d'espace [86]. La couche externe de la membrane, en contact avec les tissus mous, est perforée par de larges rectangles pour permettre l'infiltration du tissu conjonctif et permettre ainsi l'intégration tissulaire de la membrane. La couche interne, en contact avec le défaut, est perforée par de petits cercles pour prévenir l'infiltration cellulaire au sein du défaut. Toutefois, le PLA présente une lente dégradation *in vivo* avec le relargage de produits acides pouvant entraîner une réaction à corps étranger [2]. Afin d'améliorer la dégradation du PLA, ce dernier peut être conjugué avec du PGA pour créer un copolymère, l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) [87]. Une étude pré-clinique d'un défaut alvéolaire canin a démontré une résorption et une réparation similaires entre la membrane collagénique (Bio-Gide®) et la membrane en PLGA [88]. Bien que les membranes en PCL ne produisent pas de produits de dégradation acides comparées au PLA ou PLGA, leur résorption *in vivo* est très lente (pouvant aller de 2 à 3 ans) [87]. De plus, la nature hydrophobe du PCL limite l'adhésion et la prolifération cellulaire. On le retrouve alors très souvent associé à d'autres polymères naturels pour une application en ROG [89–91].

Les avantages et les inconvénients des membranes résorbables en polymères synthétiques sont répertoriés dans le **Tableau IV**.

Polymères synthétiques	Produits commercialisés	Temps de résorption	Avantages	Inconvénients
PLA	Guidor®	13 mois†	Biocompatible Biodégradable	Rigidité Relargage de produits de dégradation toxiques Inerte
PLGA	Resolut LT®	5-6 mois†	Biocompatible Biodégradable Propriété mécanique modulable	Inerte

PCL	24-36 mois [▫]	Biocompatible Stabilité mécanique (résistant à la déformation)	Dégradation lente <i>in vivo</i> Inerte
-----	-------------------------	--	---

Tableau IV : Avantages et inconvénients des membranes issues de polymères synthétiques

† données du fabricant, [▫] données d'études pré-cliniques

2.4 Les membranes de troisième génération

2.4.1 Les membranes de type Janus

Les membranes Janus ont récemment été développées pour des applications médicales tels des pansements, pour l'hémostase ou pour la régénération osseuse. Ces membranes possèdent la particularité d'avoir deux faces opposées aux propriétés physicochimiques contraires : une face (notée A) est hydrophile et une face (notée B) est hydrophobe [92]. En fonction de la disposition de la membrane sur la lésion (plaie, défaut osseux), le fonctionnement de la membrane sera différent. Si la face A (hydrophile) est en contact direct, la membrane jouera un rôle absorbant pour assécher la surface au contact. À l'inverse, si la face B (hydrophobe) est au contact de la lésion, la membrane aura un rôle barrière en empêchant l'infiltration de cellules ou de micro-organismes. Lai *et al.* ont développé une membrane de type Janus à base de fluorure de polyvinylidène ferroélectrique (PVDF) afin de moduler le microenvironnement électrique au niveau du défaut osseux et ainsi orienter la prolifération et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices et fibroblastiques (**Figure 18**) [93]. Ils ont démontré la possibilité de restaurer à la fois le tissu gingival et le tissu osseux au niveau de la lésion dans un défaut mandibulaire chez le rat. Toutefois, des études sur la résorption de ce type de membrane n'ont pas encore été menées pour déterminer leurs futures applications en clinique pour la ROG.

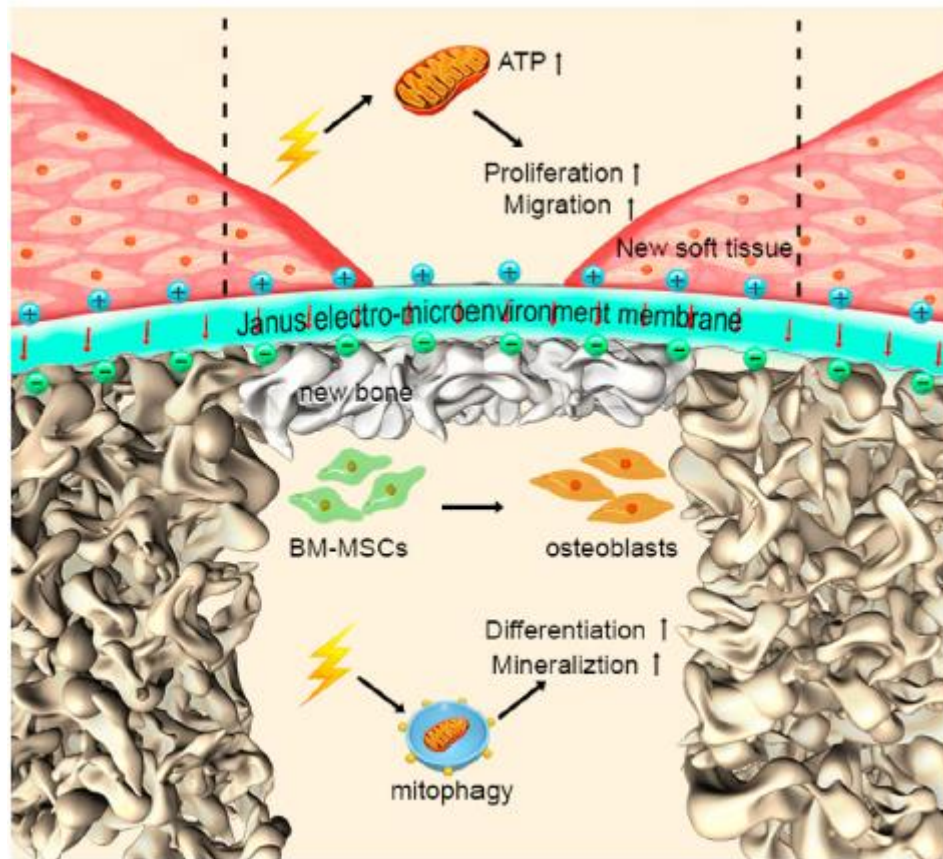


Figure 18 : Représentation schématique du fonctionnement de la membrane en PVDF pour la cicatrisation des tissus gingivaux et osseux [93].

2.4.2 Les membranes en alliage métallique à base de magnésium

Les membranes usuelles en alliage métallique, bien que robustes, sont non résorbables et nécessitent un second temps chirurgical. De nouvelles études cherchent ainsi à développer des membranes métalliques résorbables à base de magnésium (Mg) afin de s'affranchir de cette seconde étape. Des expérimentations animales chez le rat ou le lapin ont été menées pour démontrer la biocompatibilité et la dégradabilité de ces membranes [94–97]. Comparée avec une membrane Ti dans un défaut de calvaria chez le lapin, la membrane Mg a révélé une meilleure régénération osseuse, 2 semaines après implantation ($p < 0.05$) [96]. Deux études de cas cliniques réalisées sur 6 patients ont testé l'efficacité d'une nouvelle membrane résorbable à base de Mg (NOVAMag®) en dentisterie [94,98]. La première étude (4 patients) portait sur une nouvelle technique chirurgicale utilisant la membrane en Mg comme barrière pour maintenir l'alvéole (*Figure 19*). Un implant est ensuite placé et stabilisé avec un substitut osseux. L'ensemble est ensuite recouvert d'une membrane collagénique. La cicatrisation du tissu gingival et de l'os alvéolaire a été observée chez les 4 patients. La seconde étude de cas

(2 patients) a employé la membrane en Mg directement comme membrane pour la ROG. Elle a été stabilisée avec des vis de fixation en Mg (NOVAMag®) afin d'utiliser un système totalement résorbable (vis et membrane) [98].

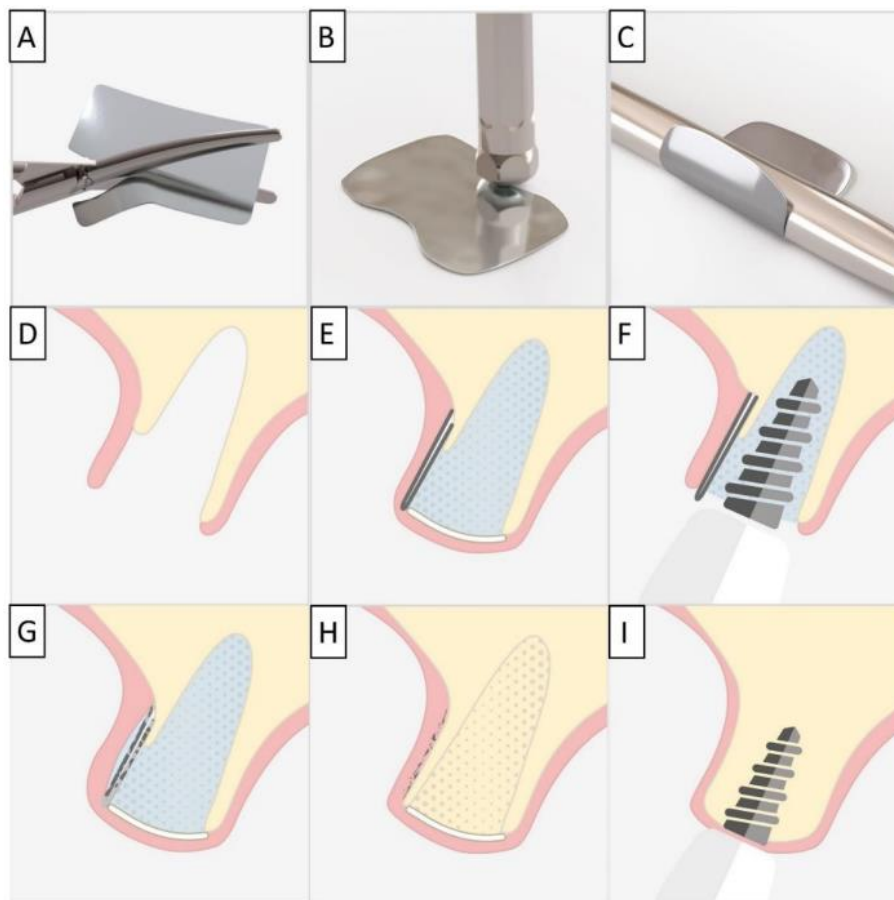


Figure 19 : *Utilisation d'une membrane en Mg comme bouclier dans le cadre de la reconstruction d'os alvéolaire. (A-C) La membrane est découpée puis façonnée à la forme désirée, (D-F) la membrane est apposée pour maintenir la pose de l'implant avec le substitut osseux puis le site lésé est recouvert par une membrane collagénique, (G-I) la membrane en Mg se dégrade progressivement et l'os se régénère progressivement [98].*

3 Les substituts osseux pour la régénération osseuse guidée

Un substitut osseux est défini comme « un biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique destiné à l'implantation [...], dans la perspective d'une reconstruction du stock osseux, par le renforcement d'une structure osseuse ou le comblement d'une perte de substance osseuse » [99]. L'autogreffe, ou greffe autologue, est la technique de référence en application clinique [100]. Elle consiste à prélever chez un même patient une greffe osseuse (souvent au niveau de l'os iliaque) pour l'implanter au niveau du site lésé. Cette technique présente toutes les propriétés requises pour favoriser la régénération de l'os (*i.e.*, ostéogenèse, ostéoconduction

et ostéo-induction) sans présenter de risque immunogénique. Toutefois la morbidité au niveau du site d'extraction ainsi qu'une quantité limitée représentent ses principales limites [101].

On distingue différents types de substituts en ingénierie tissulaire osseuse (ITO) [101,102] qu'ils soient d'origine naturelle (*e.g.*, humaine, animale), d'origine synthétique (*e.g.*, céramiques, métaux, de polymères) ou dérivés de matériaux composites (*e.g.*, polymères synthétiques et/ou naturels pouvant être associés à des facteurs de croissance ou des produits cellulaires) (*Figure 20*).

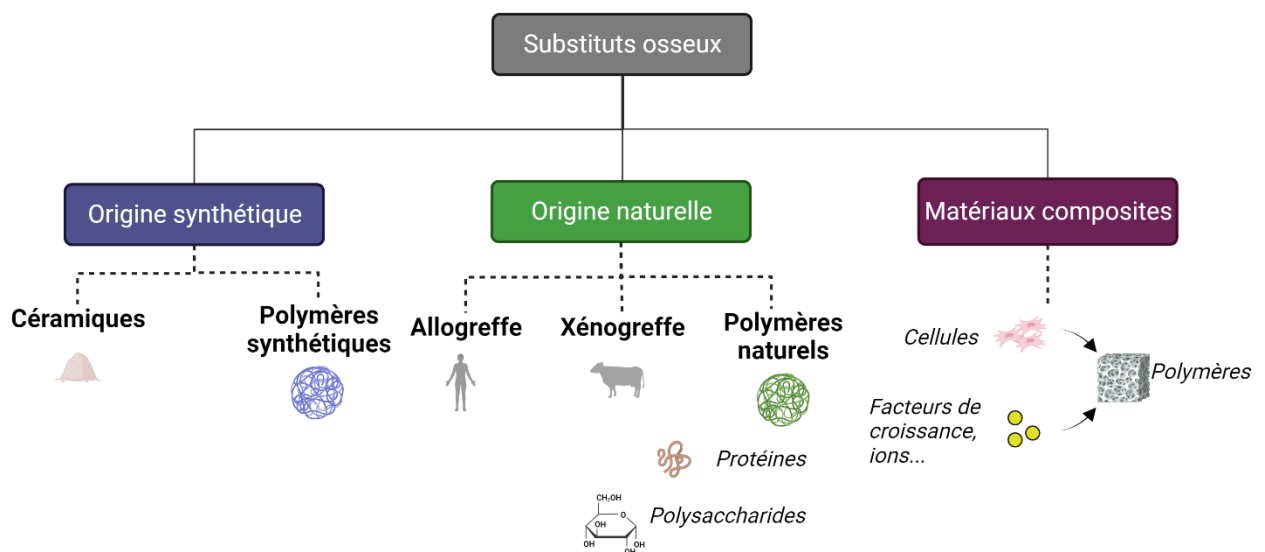


Figure 20 : Les différents types de substituts osseux pour la régénération osseuse.

3.1 Cahier des charges des substituts osseux pour la ROG

Afin de développer des substituts osseux qui répondront au mieux aux attentes biologiques précédemment citées, différents critères sont requis pour assurer la faisabilité de la ROG (*Figure 21*) [32,33].

- **Biocompatibilité** : les matériaux implantés doivent être tolérés par le corps humain et doivent limiter la réaction à corps étranger. Leur dégradation progressive ne doit pas engendrer le relargage de substances nocives.
- **Porosité** : la porosité joue un rôle clé dans le transport des nutriments et le développement de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et des cellules ostéogéniques (ostéogenèse) [103]. Aucun consensus n'existe à l'heure actuelle pour

définir la porosité optimale d'un matériau idéal pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Toutefois, deux types de porosité ont été décrites. Une microporosité (taille de pores $\leq 10 \mu\text{m}$) permet l'adhésion cellulaire et le transport de nutriments. Une macroporosité (taille de pores $\geq 100 \mu\text{m}$) permet l'infiltration cellulaire au sein du matériau pour initier l'angiogenèse et la croissance osseuse.

- **Biodégradabilité** : les matériaux doivent *in fine* être remplacés par le tissu osseux. Leur dégradabilité ne doit pas impacter les tissus environnants.

- **Propriétés mécaniques** : Afin de supporter les tissus mous et durs environnants, les matériaux pour la ROG doivent posséder des propriétés mécaniques similaires à celles de l'os cortical ou celles de l'os spongieux.

- **Bioactivité** : il s'agit de la capacité d'un matériau à se lier chimiquement avec le tissu osseux [100,104]. Pour une régénération homogène, un substitut osseux idéal doit permettre la mise en place de trois phénomènes distincts [99] :
 - (i) **Ostéogenèse** : au niveau de la lésion osseuse, les ostéoblastes doivent être capables de sécréter du tissu ostéoïde (tissu collagénique non minéralisé) qui se minéralisera progressivement pour former le tissu osseux.
 - (ii) **Ostéo-induction** : le matériau doit promouvoir la différenciation de cellules ostéoprogénitrices ou de cellules non différenciées vers la lignée ostéoblastique.
 - (iii) **Ostéoconduction** : le matériau doit permettre l'adhésion des ostéoblastes et des cellules ostéoprogénitrices pour favoriser la migration cellulaire et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour supporter la synthèse du nouveau tissu osseux.

- **Angiogenèse** : les matériaux doivent promouvoir l'angiogenèse et la vascularisation au sein du substitut osseux.

- **Maniabilité** : les matériaux pour la ROG doivent être pensés aussi bien pour le patient que pour le chirurgien. La manipulation de ces matériaux doit être facilitée pour permettre un maintien efficace au niveau de la lésion.

- **Procédés de fabrication et stérilisation** : les matériaux doivent être facile à produire. Le choix du procédé de stérilisation doit être pensé afin d'inclure les éventuelles dégradations du produit lors de la stérilisation.

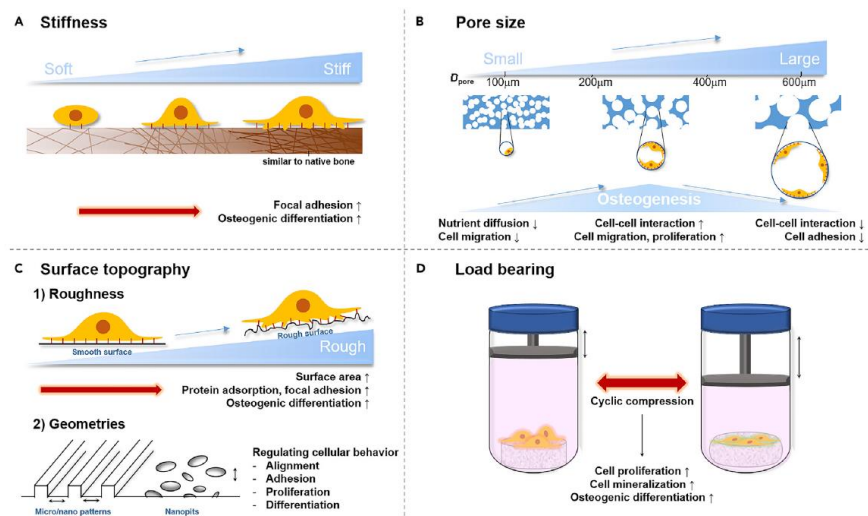


Figure 21 : Les différents critères requis pour le développement de substituts osseux pour la régénération osseuse guidée [103].

3.2 Les substituts osseux d'origine synthétique

3.2.1 Les substituts osseux à base de céramiques

En médecine régénérative, l'emploi de biocéramiques comme substituts osseux a été répertorié en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale [105,106]. Ces matériaux produits à partir de minéraux métalliques (calcium, silicium) et non-métalliques (phosphore, soufre, oxygène) sont obtenus par voie sèche à hautes températures (par frittage) ou par voie humide à basses températures (par précipitation) afin d'obtenir une structure plus ou moins cristalline en fonction du procédé utilisé [106]. Près de 60% des substituts osseux utilisés contiennent des céramiques utilisées seules ou combinées à d'autres matériaux [101]. Leur activité biologique par échanges ioniques entre les céramiques et le tissu hôte leur confère des propriétés d'ostéoconductivité et d'ostéo-intégration. Ces céramiques peuvent se trouver sous différentes formes comme des poudres, des granules, des blocs poreux ou des ciments. Quelques types de céramiques seront traités dans la suite de ce manuscrit.

3.2.1.1 Les phosphates de calcium

Les phosphates de calcium sont utilisés en dentisterie depuis les années 1970 et en orthopédie depuis les années 1980 [101]. L'hydroxyapatite (HA) et les phosphates tricalciques (TCP) sont les plus couramment employés et sont présents sous différentes porosités. Ces éléments ont été utilisés pour leurs propriétés ostéo-conductrices, leur biocompatibilité, leur non-

immunogénicité et leur bonne résistance mécanique. Le rapport atomique calcium/phosphate (Ca/P) permet d'établir leur dégradabilité [30]. Ainsi, un phosphate de calcium avec un rapport atomique Ca/P inférieur à 1 ne sera pas stable du fait de sa rapide résorption (forte dissolution). Tandis que pour un rapport atomique Ca/P supérieur à 1,67, le phosphate de calcium montrera une résorption plus lente.

Hydroxyapatite

L'hydroxyapatite (HA) est un phosphate de calcium de formule chimique stœchiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ comportant un ratio Ca/P de 1,67 [30]. Par abus de langage, elle est souvent comparée à l'hydroxyapatite carbonatée retrouvée dans les os, parce qu'ayant des structures chimiques similaires comprenant un agencement semblable (forme cristalline hexagonale) [107]. Du fait de sa macroporosité et de la présence de pores interconnectés, l'HA s'intègre à la matrice extracellulaire du tissu osseux permettant une bonne ostéo-intégration du matériau (adhésion, prolifération et différenciation des cellules ostéoprogénitrices) [108,106,101,109–111].

Phosphates tricalciques (TCP)

Les phosphates tricalciques (TCP) ont pour formule chimique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ et comportent un rapport atomique Ca/P de 1,5 [101,106]. Ils peuvent se trouver sous deux formes différentes de cristallinité : α -TCP (obtenue par frittage à plus de 1125°C) et β -TCP (obtenue par frittage en dessous de 1125°C) [108]. Le β -TCP est plus utilisé que l' α -TCP parce qu'il se résorbe plus rapidement et est la forme la plus stable dans des conditions physiologiques. Ses pores interconnectés favorisent l'invasion de vaisseaux sanguins et il est progressivement substitué par du nouvel os. Toutefois, sa partielle conversion en HA une fois implanté est systématique rendant sa résorption incontrôlée (pouvant aller de 6 à 24 mois) [17].

L'association d'HA et de β -TCP, appelée phosphate de calcium biphasique (BCP), a montré dans différentes études les propriétés ostéoconductrices et une meilleure résorption de ces matériaux [17,101,106]. Ces substituts sont commercialisés sous différents noms comme par exemple Ceraform® (Teknimed) [112].

Whitlockite (WH)

La whitlockite (WH) est un dérivé de phosphate de calcium dont un des ions Ca^{2+} a été substitué par un ion Mg^{2+} de formule chimique $\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$ [113]. La WH est également retrouvée dans la composition de la phase minérale osseuse (constituant environ 25% de la

fraction inorganique osseuse) [103]. Comparée à l'HA, la WH est moins stable à pH physiologique. Elle se résorbe donc plus rapidement *in vivo* (rapport atomique Ca/P de 1,43) libérant alors des ions Mg^{2+} et PO_4^{3-} dans la matrice extracellulaire (MEC) qui favoriseront l'ostéogénèse.

3.2.1.2 Les matériaux à base de silicium : les bio-verres

Elaboré par Hench *et al.* en 1969, le premier bio-verre, intitulé 45S5, était composé de silice, d'oxyde de sodium, d'oxyde de calcium et d'oxyde de phosphore (45 SiO_2 – 24,5 Na_2O – 24,5 CaO – 6 P_2O_5 (m/v %)) [114,115]. Ces bio-verres forment une classe intéressante de matériaux pour la régénération osseuse car ils sont biocompatibles, ostéoconducteurs et se lient aux tissus mous et durs grâce à la formation *in situ* d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée par biominéralisation [116,117]. Ce mécanisme n'est pas encore bien compris. Une des explications les plus probables impliquerait un échange d'ions à la surface du bio-verre par l'action des fluides biologiques, activant ainsi les fonctions hydroxyle (HO^-) du silicium (Si) (**Figure 22**) [30,114]. Ces groupements HO^- vont alors se condenser et polymériser pour former des ponts Si-O-Si (couche riche en SiO_2). La migration d'ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} provenant des fluides biologiques entraîne la formation d'une couche phospho-calcique amorphe. La cristallisation de cette couche par l'apport d'ions HO^- et CO_3^- forme alors la couche d'hydroxyapatite. En fonction de la composition des bio-verres, le relargage d'ions Na^+ , P^{5-} , Si^{2+} ou d'ions métalliques bivalents (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} ...) à la surface du bio-verre active une cascade de voies de signalisation favorisant l'angiogénèse et l'ostéogénèse.

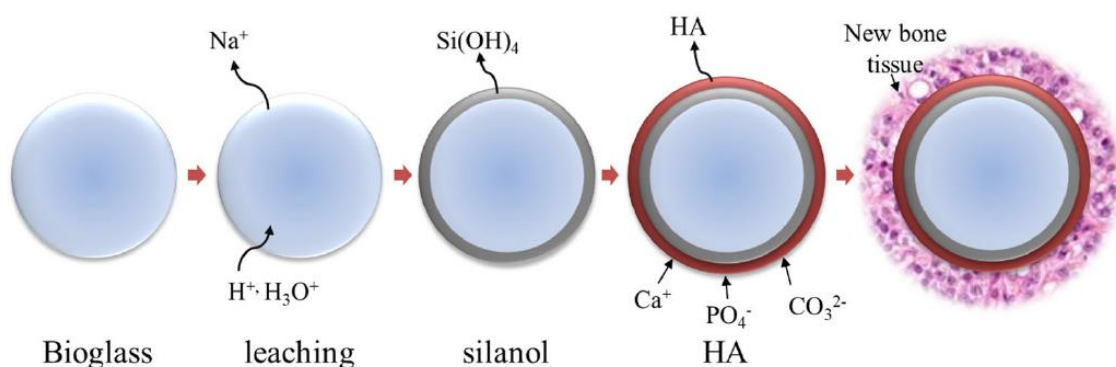


Figure 22 : Mécanisme de la formation d'une couche d'hydroxyapatite à la surface d'un bio-verre [30].

3.2.1.3 Les sulfates de calcium

Aussi connu sous le nom de « plâtre de Paris », les sulfates de calcium de formule chimique CaSO_4 ont été utilisés dès 1892 pour leurs propriétés ostéoconductrices et leur résorption rapide (de 4 à 12 semaines) [17,101]. Ne possédant pas de structure macroporeuse, ces sulfates sont employés sous forme de granules ou de pâte injectable pour combler de petits défauts osseux en combinaison avec des fixations internes. Du fait de sa rapide dégradation, Nyan Jun *et al.* ont appliqué ce sulfate de calcium comme une alternative au ciment de PMMA dans la technique de Masquelet permettant ainsi de s'affranchir de la seconde étape où ce dernier devait être retiré [118].

3.2.1.4 Les carbonates de calcium

Les carbonates de calcium, de formule brute CaCO_3 , sont obtenus par purification de coraux et cristallisent sous forme d'aragonite [106]. Leur macroporosité (100 à 200 μm) est semblable à celle de l'os cortical. Ils sont biocompatibles et leur résorption dépend de l'espèce de corail utilisé, du site d'implantation et du volume utilisé.

3.2.2 Les polymères d'origine synthétique

Bien que l'adhésion cellulaire soit limitée, les polymères résorbables synthétiques possèdent des propriétés physicochimiques modulables intéressante en ITO pour contrôler leur dégradabilité, leur tenue mécanique et leur aspect [119]. Différents types de polymères synthétiques ont retenus l'attention des chercheurs ces dernières années pour des applications en régénération osseuse.

Acide polyglycolique (PGA)

L'acide polyglycolique (PGA) est un polyester thermoplastique aliphatique produit par polymérisation en chaîne de l'acide glycolique (**Figure 23**). Sa vitesse de dégradation *in vivo* par oxydation ou par hydrolyse est comprise entre 6 et 12 mois [120]. Il est utilisé en ITO pour sa biocompatibilité et sa haute cristallinité .

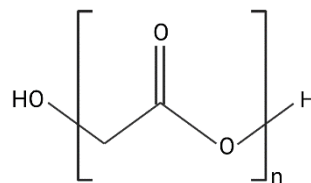


Figure 23 : Structure chimique de l'acide polyglycolique (PGA)

Acide polylactique (PLA)

L'acide polylactique (PLA) est également un polyester thermoplastique aliphatique (**Figure 24**). Il est synthétisé par l'ouverture de cycle du dimère de l'acide lactique [121]. Ce dimère possède deux formes énantiomériques : l'acide L-lactique et l'acide D-lactique. Le polymère obtenu par la forme L-lactique est biocompatible, et possède une bonne tenue mécanique. Guduric *et al.* ont étudié l'assemblage couche par couche de PLA cellularisée pour évaluer leur potentiel application en ITO [122].

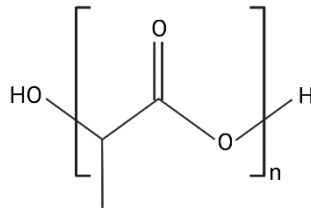


Figure 24 : Structure de l'acide polylactique (PLA)

Acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA)

Afin d'allier les propriétés physicochimiques de différents polymères, la synthèse de copolymères comme l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) (obtenu par copolymérisation de PLA et de PGA) s'avère être une combinaison intéressante pour l'ITO (**Figure 25**) [123]. Pour contrôler la dégradation *in vivo* du PLA, son association avec le PGA permet d'améliorer sa résorption tout en conservant les propriétés physicochimiques du PLA. Il est utilisé pour sa dégradabilité, sa tenue mécanique et ses propriétés ostéogéniques [124]. Babilotte *et al.* ont développé par impression 3D un matériau à base de PLGA combiné à des particules de HA [125]. Les études menées *in vitro* ont démontré le potentiel ostéogénique de ce matériaux sur des MSCs issues de moelle osseuse.

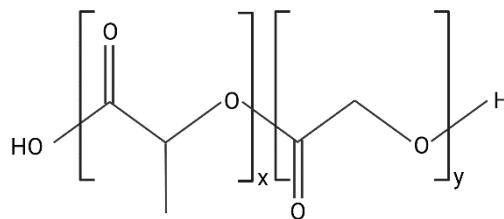


Figure 25 : Structure de l'acide poly(glycolique-co-lactique) (PLGA)

Polycaprolactone (PCL)

Le polycaprolactone (PCL) est un polyester biodégradable synthétisé par l'ouverture de cycle et polymérisation du ϵ -caprolactone (**Figure 26**) [2]. Comparé aux autres polyesters précédemment cités, le PCL possède un procédé de fabrication plus accessible et est stable à hautes températures, facilitant son modelage pour l'application désirée [126]. Il est utilisé comme substitut osseux en favorisant l'adhésion et la prolifération cellulaire [127]. Combiné avec des céramiques (*e.g.*, HA), le PCL a été étudié dans des modèles pré-cliniques de défauts de calvaria [128]

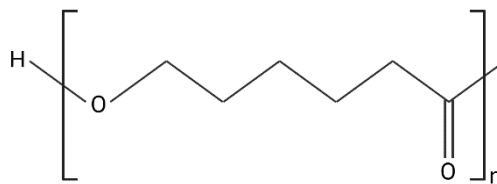


Figure 26 : Structure du poly-(ϵ -caprolactone) (PCL)

Polyéthylène glycol (PEG)

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère hydrophile synthétisé par la déshydratation et la polycondensation de l'éthylène glycol (**Figure 27**) [129]. Il est utilisé en médecine régénérative comme vecteur pour délivrer certaines biomolécules (comme des facteurs de croissance) [123,130,131]. Le PEG est biocompatible, non-immunogénique et il n'adsorbe pas les protéines à sa surface, permettant alors leur encapsulation et leur délivrance *in vivo* [132]. Ce polymère peut être linéaire ou ramifié (à 4, 6 ou 8 branches). Cheng *et al.* ont développé un substitut osseux à base de PEG (à 4 branches) combiné avec des nanoparticules de CaP encapsulées dans des lisozomes [133]. Implanté dans un défaut de calvaria chez le rat, le PEG combiné avec CaP a montré une meilleure régénération du défaut comparé à la condition vide après 8 semaines.

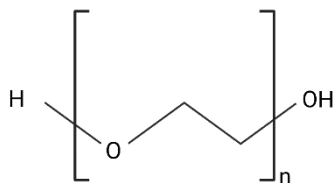


Figure 27 : Structure linéaire du polyéthylène glycol (PEG).

3.3 Les substituts osseux d'origine naturelle

3.3.1 Les substituts osseux d'origine humaine : L'allogreffe

L'allogreffe consiste à prélever chez un autre individu (*i.e.*, donneur, cadavre) un greffon à implanter chez le patient. Les allogreffes sont ostéoconductrices et ont un potentiel ostéo-inducteur limité si elles sont préservées sous forme congelée et/ou déminéralisée. Elles peuvent présenter un risque immunogénique ainsi que des problèmes d'ostéo-intégration en fonction de la qualité du greffon implanté. Elles se résorbent plus rapidement que l'autogreffe.

3.3.2 Les substituts osseux d'origine animale

3.3.2.1 La xénogreffe

La xénogreffe provient d'une espèce différente de celle du receveur. Afin de limiter la transmission d'agents pathogènes, cette dernière est traitée selon différentes procédures (chimiques ou physiques) pouvant altérer leurs propriétés ostéo-inductrices. Elles présentent toutefois des propriétés ostéoconductrices et sont disponibles en plus large quantité que les greffes allogéniques.

3.3.2.2 Les protéines

Collagène

Le collagène est une protéine constituée par la répétition de trois monomères d'acides aminés : glycine, proline et hydroxyproline (**Figure 32**) [134]. Le collagène est la principale composante de la MEC. Dans le corps humain, 90% du collagène est retrouvé sous forme de collagène de type I, II et III. Le collagène de type I est principalement retrouvée dans les os et les tendons. Les collagènes de type II et III sont retrouvés dans les tissus mous et le cartilage. Le collagène est très largement utilisé en ITO pour sa biocompatibilité, sa dégradabilité, sa haute porosité, sa faible immunogénicité ainsi que sa facilité de fabrication [135]. Yao *et al.* ont combiné une matrice en collagène avec des particules de HA pour développer un substitut implantable [136]. Testé dans un défaut critique de calvaria chez le rat, le défaut était pratiquement régénéré 6 mois après implantation comparé au défaut laissé vide.

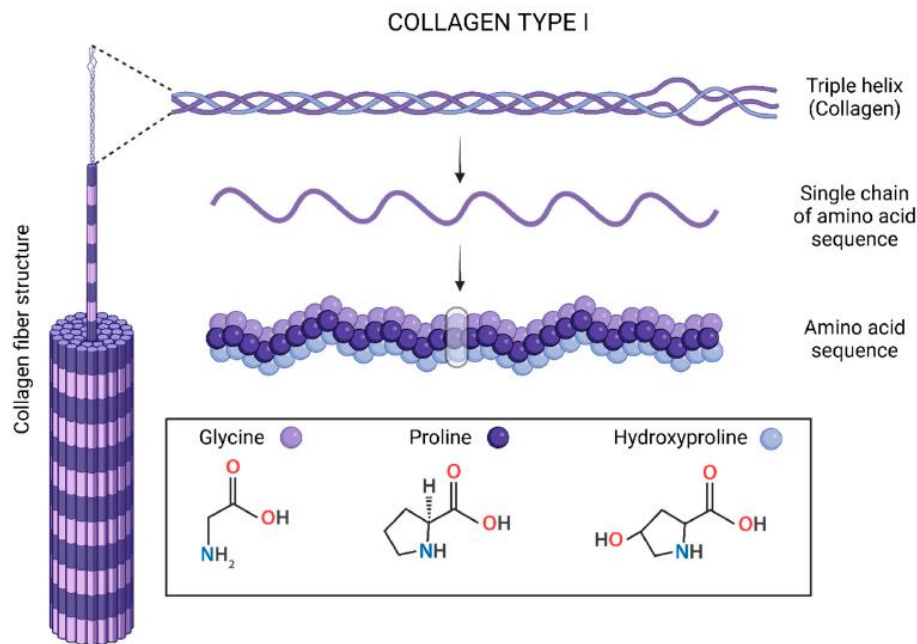


Figure 32 : Structure du collagène de type I [134].

Gélatine

La gélatine est obtenue par hydrolyse et dénaturation du collagène par traitement avec un acide ou une base (**Figure 33**) [137]. Elle possède une structure similaire à celle du collagène avec la répétition de trois acides aminés de type Glycine-X-Y, où X et Y représentent des acides aminés [134]. On retrouve notamment la séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) qui est un site d'adhésion cellulaire où les intégrines des parois membranaires peuvent se lier [138]. En clinique, la gélatine est utilisée pour fabriquer des gélules, des comprimés ou des éponges.

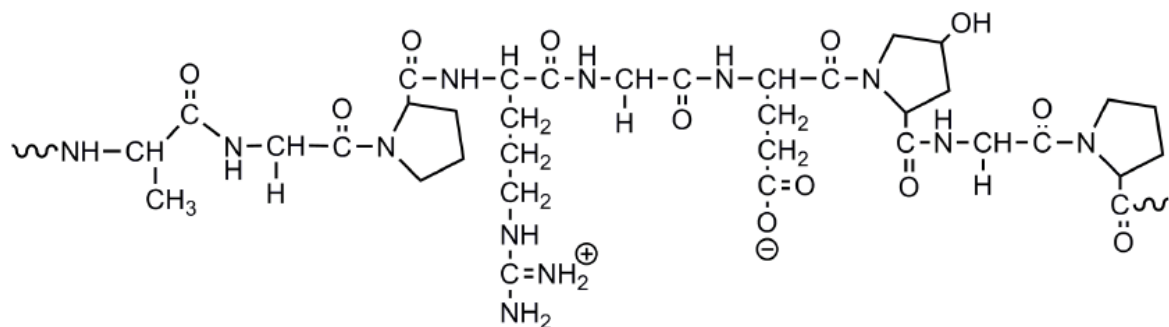


Figure 33 : Structure de la gélatine [137].

Fibroïne de soie

La fibroïne de soie est une protéine fibreuse sécrétée par certains insectes (*Bombyx mori*) ou certains arachnides (**Figure 34**) [139]. Elle est majoritairement constituée de trois acides

aminés : glycine (46%), alanine (30%) et serine (12%). Elle est composée d'une chaîne lourde hydrophobe (conformation en feuillets β) qui assure la rigidité de la protéine, ainsi que d'une chaîne légère hydrophile (conformation random coil) [140,141]. La fibroïne de soie a été utilisée en ITO pour sa dégradabilité, ses propriétés mécaniques (sa résistance à la traction compris entre 300 et 740 MPa), et sa biocompatibilité entraînant une légère réaction inflammatoire [103,140]. En clinique, elle est utilisée comme fils de suture mais les recherches actuelles en ITO développent des matériaux à base de fibroïne de soie sous forme de fibres, de mousse, d'hydrogel ou de membrane.

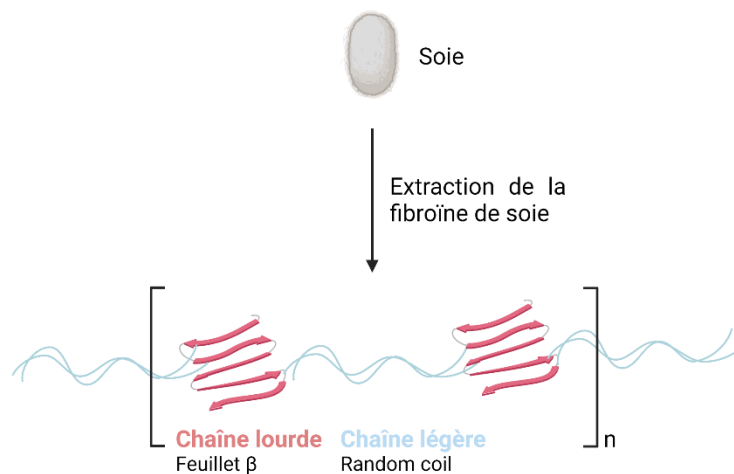


Figure 34 : Représentation schématique des fibroïnes de soie. Adapté de [140].

3.3.3 Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des molécules à haut poids moléculaires comportant 100 à 90 000 monomères (saccharides) reliés entre eux par une liaison glycosidique [142]. Ils peuvent être linéaires ou ramifiés.

3.3.3.1 Les polysaccharides d'origine végétale

Cellulose

La cellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Elle est retrouvée dans la paroi cellulaire des plantes mais elle est aussi sécrétée par certaines bactéries (*e.g.*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*...) [85,143]. Elle est constituée par la répétition de D-glucoses liés en β -(1,4) (**Figure 35**). Utilisée pure, la cellulose n'est pas dégradée par le corps humain et est insoluble dans l'eau [144]. Néanmoins, la cellulose extraite de bactérie est le plus souvent utilisée en ingénierie tissulaire car elle présente une forme pure, dépourvue de certains

composés synthétisés par les plantes (e.g., lignine, hémicellulose...). Elle est utilisée comme substitut osseux dans de nombreux modèles pré-cliniques chez le rat [144,145].

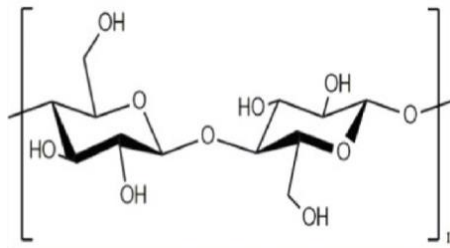


Figure 35 : Structure de la cellulose [143]

Les sels d'alginate

Les alginates sont un sous-groupe de polysaccharides linéaires anioniques produits à partir d'un copolymère de l'acide D-mannuronique et de l'acide α -L-glucuronique liés en β -(1,4) (**Figure 36**) [129,137,146]. Ils sont extraits des parois cellulaires de certaines algues (algues brunes) et se trouvent sous forme de sels de calcium, de sodium ou de magnésium. Ils peuvent également être sécrétés par certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Azotobacter vinelandii*. Seuls les sels d'alginate extraits des algues brunes sont utilisés en industrie (approuvé par la FDA en 1973). Ils sont utilisés pour leur potentiel à former un gel, leur bioactivité, leur potentiel à minéraliser, leur renforcement des propriétés mécaniques et l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL).

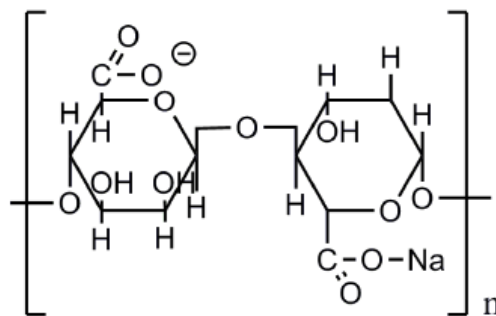


Figure 36 : Exemple de la structure d'un sel d'alginate, cas de l'alginate de sodium [137].

3.3.3.2 Les polysaccharides dérivés de micro-organismes

Les polysaccharides issus de micro-organismes sont appelés exopolysaccharides car ils sont sécrétés depuis les enzymes ancrées dans la paroi membranaire de ces micro-organismes.

Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide cationique linéaire constitué de D-glucosamine lié en β -(1,4) au N-acétyl-D-glucosamine (**Figure 37**) [146]. Il est obtenu par désacétylation chimique

ou enzymatique de la chitine, un polysaccharide extrait de la peau des crustacés ou retrouvé dans la paroi cellulaire de certains micro-organismes (bactérie, champignon) [2]. Il a été montré que le chitosane était biocompatible, ostéoconducteur, antibactérien, immuno-modulateur et qu'il favorisait la formation osseuse *in vivo* [135]. Il est utilisé sous forme de membrane, de fibres ou d'éponge dans ces applications médicales. Son utilisation seule présente cependant des limites liées à sa solubilité en milieu acide (à des pH compris entre 6 et 6,5) et à sa rapide résorption *in vivo* [129].

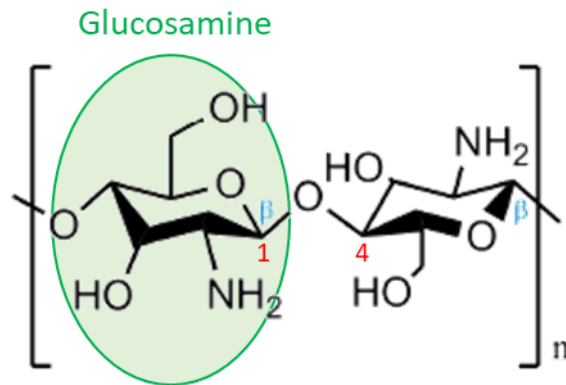


Figure 37 : Structure du chitosane [137].

Dextrane

Le dextrane est un exopolysaccharide formé par la répétition de glucoses liés entre eux en α -(1,6) (**Figure 38**) [147]. Il se décline sous différentes formes : linéaires ou ramifiés, en fonction de la bactérie qui l'a sécrété. Il a été le premier exopolysaccharide à avoir été utilisé dans l'industrie pharmaceutique comme substitut de plasma sanguin (1953) [142]. Il est également employé comme pansement ou fil de suture. Il est utilisé dans l'industrie alimentaire comme stabilisateur de produits surgelés [148].

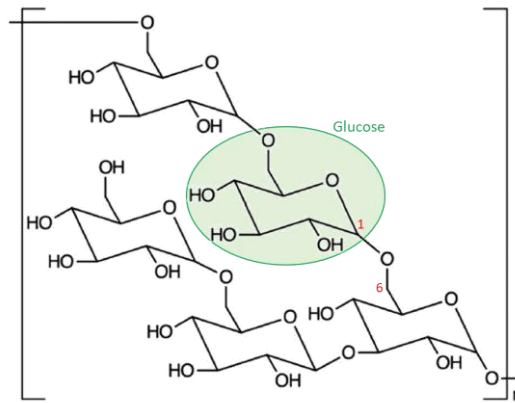


Figure 38 : Structure du dextrane [149].

Pullulane

Le pullulane est un exopolysaccharide linéaire formé par la répétition de maltotriose (constitué de trois unités de glucose lié en α -(1,4)) relié par une liaison glucosidique en α -(1,6) (**Figure 39**) [150]. Il est sécrété par le champignon *Aureobasidium pullulan*. Il a initialement été utilisé dans l'industrie pharmaceutique comme excipient de comprimés ou gélules pour sa capacité à former des films résistants et flexibles et pour son imperméabilité à l'oxygène (approuvé en 2002 par la FDA [151]) [149].

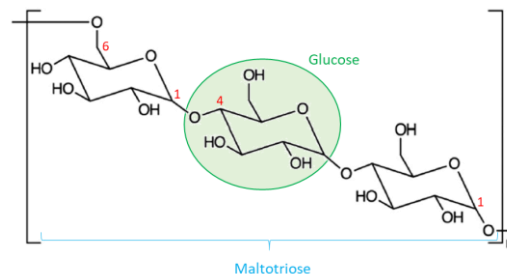


Figure 39 : Structure du pullulane [149].

L'utilisation du dextrane et/ou du pullulane en ingénierie tissulaire osseuse sera discutée à la section **3.5.** de ce manuscrit dans une revue systématique de la littérature.

Le **Tableau V** récapitule les propriétés et quelques limites des substituts osseux précédemment décrits :

	Ostéo- conduction	Ostéo- induction	Ostéogènes	Limites
Autogreffe	+	+	+	Morbidité du site donneur Quantité limitée Résorption rapide
Allogreffe	+	+/-	-	Risque de transmission d'agent pathogène
Xéno greffe	+	-	-	Risque de transmission d'agent pathogène Résorption lente voir non- résorbable
Céramiques	+	-	-	Cassante Résorption lente à très lente
<i>naturels</i>				Risque immunogénique Faible tenue mécanique Résorption rapide
Polymères	+	-	-	Coût
<i>synthétiques</i>				Hydrophobicité Résorption lente

Tableau V : Les différentes propriétés de quelques substitus osseux et leurs limites
[30,85,152]

3.4 Les matériaux composites

Les matériaux composites permettent de combiner les propriétés physicochimiques et/ou biologiques de deux matériaux différents et ainsi compenser les défauts de l'un et de l'autre. Différentes associations peuvent être envisagées en ITO comme un mélange de polymères synthétiques et naturels, un mélange de polymères et de céramiques ou l'incorporation d'éléments biologiques (*e.g.*, ions, facteurs de croissance, cellules).

3.4.1 Les polymères synthétiques et naturels

Les polymères naturels se résorbent rapidement *in vivo* et possèdent de faibles propriétés mécaniques. À l'inverse, les polymères synthétiques se dégradent beaucoup plus lentement et ont des propriétés mécaniques modulables (en fonction de leur cristallinité). L'association de

polymères naturel et synthétique permet de compenser les limites de l'un des matériaux [30]. Des exemples sont présentés dans la revue systématique de la littérature (voir section 3.5.) où l'association du dextrane avec des polymères synthétiques a été reportée (*e.g.*, PEG, PVF).

3.4.2 Les polymères naturels combinés à des phosphates de calcium

L'association de phosphate de calcium comme l'HA à des biopolymères permet de renforcer les propriétés mécaniques de ces derniers mais également de rendre le matériau ostéoconducteur. Cela permet également de rendre plus malléable ces phosphates de calcium qui sont connus pour être cassants [105]. Dans un mélange de pullulane et de dextrane, de l'HA a été incorporée pour former des microbilles. Ce matériau a montré des propriétés ostéoconductrices remarquables dans différents modèles pré-cliniques en comparaison à des substituts osseux déjà commercialisés [153–155].

3.4.3 Les polymères synthétiques combinés à des phosphates de calcium

L'utilisation de polymères naturels peut être limitée par le risque immunogénique ou le prix élevé de ces matériaux [156]. L'emploi de polymères synthétiques permet de modifier plus facilement les propriétés physicochimiques de ces matériaux. L'incorporation d'HA dans une encre en PLGA stimule la différenciation et la prolifération de MSCs issues de moelle osseuse [125].

3.4.4 Incorporation d'ions métalliques

De plus en plus d'études s'intéressent à la délivrance ou à l'incorporation d'ions métalliques dans les matériaux afin de réguler certaines voies de signalisation (ostéo-induction). La délivrance de certains ions métalliques tels que Mg^{2+} , Sr^{2+} , Si^{4+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} , au niveau de la lésion osseuse permet d'activer différentes voies de signalisation entraînant l'angiogenèse ou l'ostéogenèse. Ces ions sont utilisés parce qu'ils sont retrouvés comme cofacteurs d'enzyme dans le corps humain (**Figure 28**) [157].

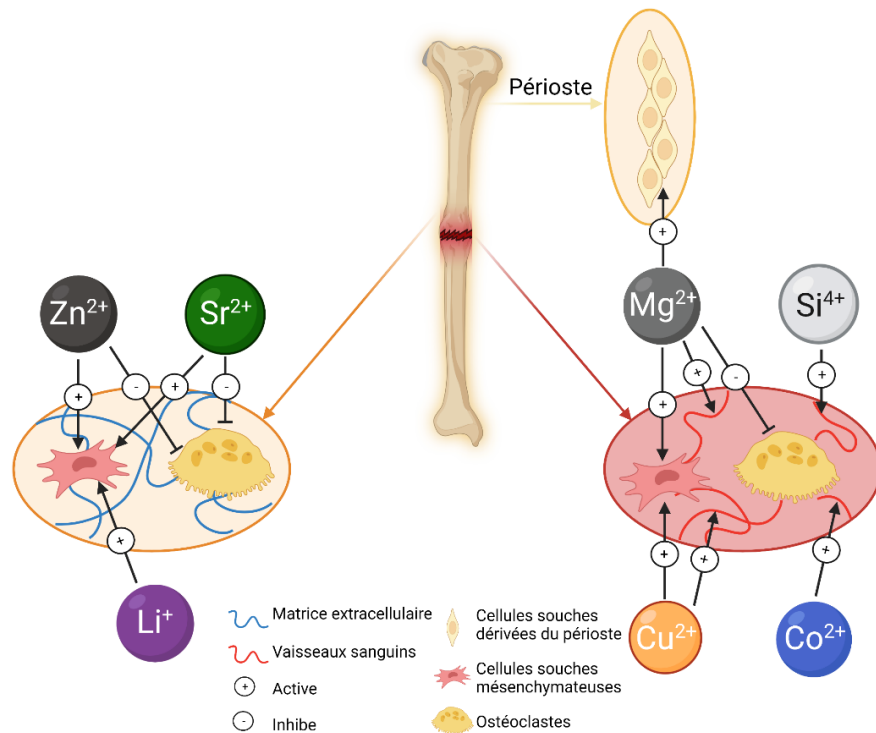


Figure 28 : Implication de certains ions métalliques dans la régénération osseuse. Adapté de [17].

Magnésium (Mg^{2+})

L'ion Mg^{2+} est le quatrième cation le plus abondant du corps humain. Il est principalement retrouvé dans les os et les dents (60% des réserves) [17]. Il est impliqué dans l'angiogenèse par l'induction de la voie HIF (Hypoxia-induced factor) qui régule l'expression des gènes régulateurs d'oxygène [158]. HIF activera PGC-1 α (proliferator-activated receptor gamma coactivator) qui stimulera la production du facteur pro-angiogénique VEGF. Mg^{2+} est également impliqué dans l'ostéogénèse en promouvant le relargage de CGRP (calcitonin gene-related peptide receptor) par les neurones de ganglions de la racine dorsale. CGRP va stimuler les cellules souches dérivées du périoste (PDSCs) qui exprimeront les gènes responsables de la différenciation ostéogénique (e.g., Sp7) [17,157].

Strontium (Sr^{2+})

L'ion Sr^{2+} est un élément non essentiel composant 0,035% de la masse minérale du tissu osseux [17]. Tout comme le calcium (Ca), le strontium appartient à la famille des métaux alcalino-terreux et possède donc des propriétés similaires au Ca. Il est impliqué dans la régulation de l'ostéogénèse en activant le récepteur CaSR (calcium sensing receptor) des ostéoblastes pour

stimuler la production d'ostéoprotégrine (OPN), protéine inhibant la voie de signalisation RANK/RANKL responsable de l'ostéoclastogénèse [159].

Zinc (Zn²⁺)

L'ion Zn²⁺ est un élément essentiel qui appartient aux métaux de transition. Il est impliqué dans la régulation, la catalyse et la structure de certaines métalloprotéases dont la PAL [17]. La PAL est responsable de la libération de phosphate dans la MEC créant un environnement alcalin favorisant la minéralisation. Zn²⁺ est un cofacteur de cette enzyme qui est sécrétée par les ostéoblastes.

Cuivre (Cu²⁺)

L'ion Cu²⁺ est également un élément essentiel qui appartient à la famille des métaux de transition. Il joue un rôle dans l'angiogénèse en imitant le facteur HIF responsable de la sécrétion de VEGF [17].

3.4.5 Les substituts osseux à base de facteurs de croissance

Les facteurs de croissance utilisés en ITO permettent la régulation de l'activité cellulaire et sont souvent associés avec des céramiques ou des ciments [160]. Ces derniers ne possédant pas de propriétés ostéo-inductrices, leur association avec des facteurs de croissance permet la stimulation de processus biologiques (ostéogénèse, angiogénèse). Ces facteurs de croissance interviennent à des étapes clés lors de la réparation osseuse comme notamment les BMPs, les FGFs ou le VEGF (*Figure 29*) [16].

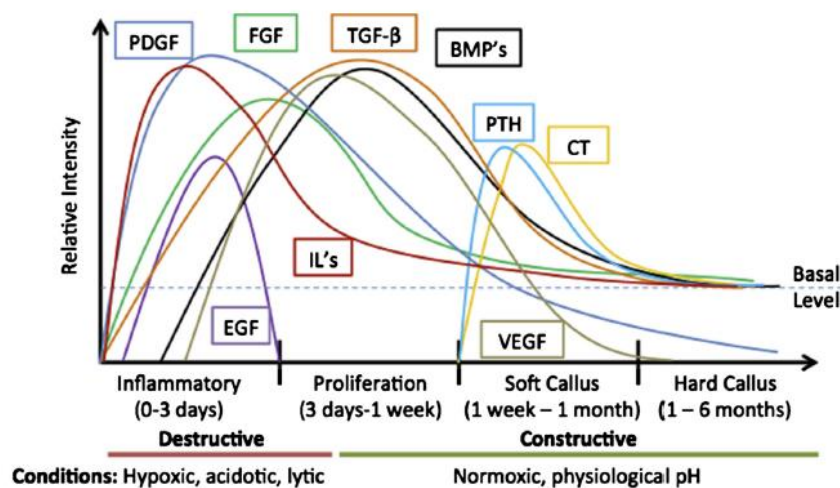


Figure 29 : Activité des différentes molécules de signalisation lors de la réparation osseuse [16].

BMPs (bone morphogenetic proteins)

Les BMPs font partie de la superfamille des TGF- β (transforming growth factor beta). Elles se déclinent sous 30 formes différentes. Plus particulièrement, les BMP-2 et -7 sont relarguées en ITO afin de stimuler la formation osseuse (**Figure 30**) [17]. La BMP-2 est capable d'induire la différenciation des MSCs en ostéoblastes, tandis que BMP-7 promeut l'angiogenèse. En clinique, ces deux facteurs de croissance sont déjà utilisés pour traiter des fractures ouvertes de tibia (BMP-2, INFUSE™, Medtronic) ou dans le cadre d'arthrodèse lombaire postérieure (BMP-7, OP-1™, Stryker) [17]. Bien qu'ostéo-inductifs, ces facteurs ne sont pas ostéoconducteurs et nécessitent l'utilisation d'éponge de collagène pour être délivrés [160]. Ils peuvent parfois former de l'os hétérotopique engendrant des chirurgies supplémentaires pour retirer le surplus d'os.

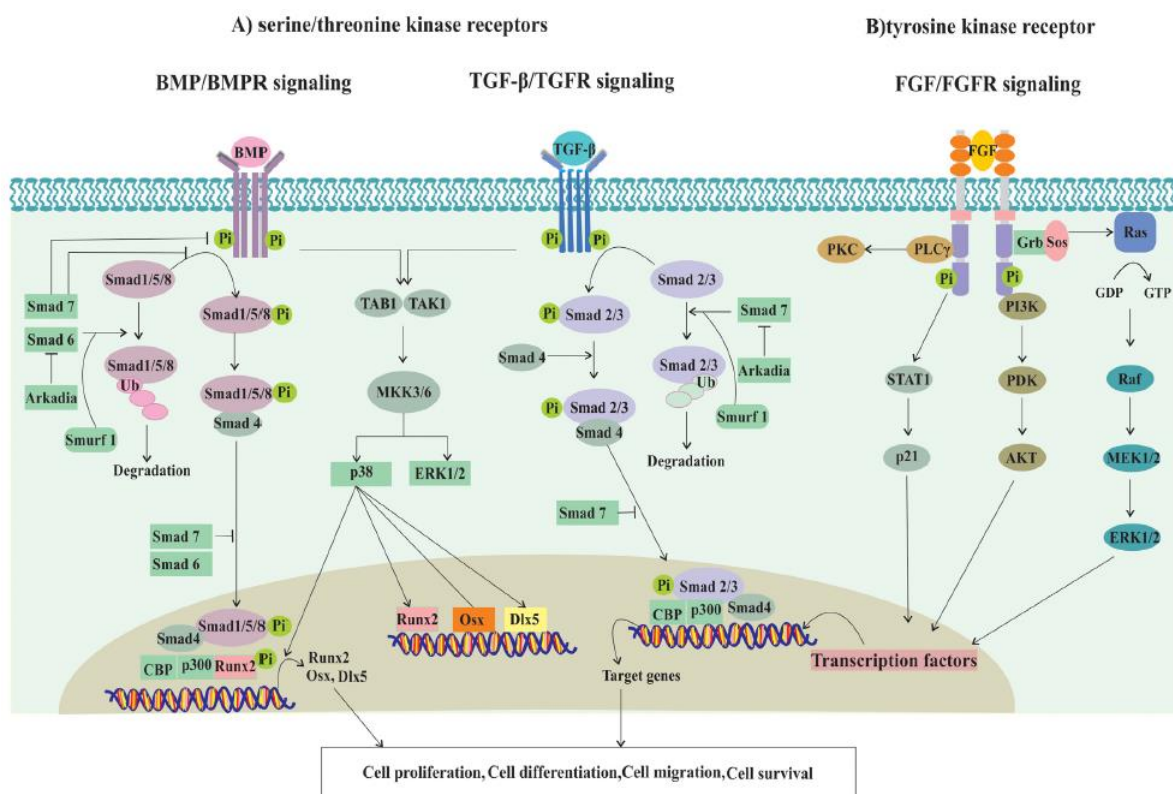


Figure 30 : Quelques voies de signalisation impliquant certains facteurs de croissance dans la formation osseuse [161].

FGFs (fibroblast growth factors)

Les FGFs sont des facteurs mitogéniques sécrétés par différents types cellulaires tels que les ostéoblastes, les chondrocytes, les monocytes et les macrophages [17]. Cette superfamille est

composée de 22 formes différentes de FGF. Ils engendrent la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire dans le micro-environnement osseux [162]. Il a été montré que bFGF (basic fibroblast growth factor) était capable de stimuler l'expression de VEGF, induisant alors l'angiogenèse.

VEGF (vascular endothelial growth factor)

Connu pour son rôle pro-angiogénique, le VEGF se décline en 5 polypeptides différents : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF (placental growth factor). Lors d'une fracture, il est sécrété dans l'hématome et régule la migration et la prolifération des cellules endothéliales [17,163]. Il est régulé par de nombreux facteurs dont HIF-1 (hypoxia growth factor-1) (**Figure 31**) [164]. En condition d'hypoxie, HIF-1 est surexprimé et s'accumule dans le noyau pour exprimer certains gènes régulant l'hypoxie. VEGF est alors sécrété par les hyperchondrocytes pour promouvoir la vascularisation au sein du cal fibreux et faciliter ainsi la synthèse de nouvel os.

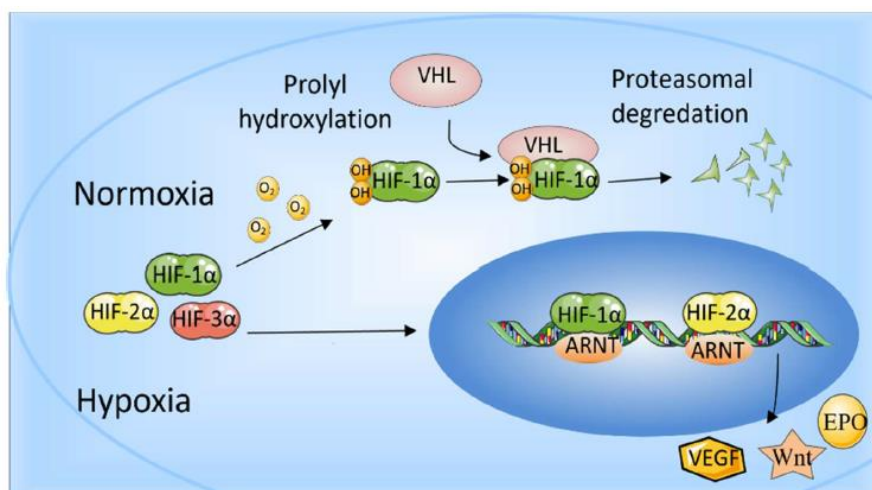


Figure 31 : Mécanisme d'action de HIF dans la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques [158].

Un résumé de quelques exemples de facteurs de croissance utilisés en ITO est présenté dans le **Tableau VI** [16,163]:

Facteurs de croissance	Source	Fonctions	Relargage idéale pour l'ITO
BMP	MSCs Ostéoblastes Chondrocytes Cellules endothéliales	Migration, prolifération et différenciation cellulaire (néo-tissu osseux)	3-21 jours
FGF	MSCs Ostéoblastes Chondrocytes Cellules endothéliales	Prolifération des ostéoblastes Angiogenèse	3-7 jours
VEGF	Plaquettes Ostéoblastes Chondrocytes Cellules endothéliales	Migration et prolifération des cellules endothéliales (angiogenèse)	14-21 jours

Tableau VI : Quelques exemples de facteurs de croissance utilisés en ITO

3.4.6 Les substituts osseux à base de produits cellulaires

Les biomatériaux utilisés en ITO peuvent également transporter des cellules ostéoprogénitrices pour favoriser la synthèse de nouveaux tissus osseux. Les cellules les plus employées sont : les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (hBMSCs), les cellules souches pluripotentes induites (iPSs) ou encore les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSCs).

L'utilisation de hBMSCs est la technique de référence en ITO car elle dispose de toutes les caractéristiques nécessaires à la régénération de l'os (i.e. ostéogenèse, ostéo-induction, ostéoconduction) [16,165]. Toutefois, la morbidité au niveau du site d'extraction, la variabilité sur la quantité de cellules extraites d'un patient à un autre et le manque de protocoles standardisés limite leur efficacité en clinique. D'autres alternatives sont développées en choisissant d'autres types cellulaires d'intérêt. Les iPSs proviennent de fibroblastes de peau qui

sont différenciées pour donner des cellules souches (par transmission rétrovirale) [166]. Elles sont capables de se différencier en ostéoblastes lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu adéquat. Cependant, leur utilisation thérapeutique peut être limitée par leur potentiel à former des tumeurs.

3.5 Article n°1 : Revue systématique de la littérature

Nous avons vu précédemment, à la section **3.4.**, les différentes combinaisons possibles pour développer des matériaux composites. Sous forme d'une revue systématique de la littérature, nous verrons ici les différentes utilisations de deux polysaccharides, le pullulane et le dextrane, comme substituts osseux en ingénierie tissulaire osseuse. Leurs associations avec des polymères naturels ou synthétiques, des céramiques, des facteurs de croissance ou des produits cellulaires ont été répertoriées dans cette revue selon les directives de la méthodologie PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). La section qui suit présente cette revue publiée sous l'intitulé « **Recent Advances of Pullulan and/or Dextran-Based Materials for Bone Tissue Engineering Strategies in Preclinical Studies: A Systematic Review** » dans le journal *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.



Recent Advances of Pullulan and/or Dextran-Based Materials for Bone Tissue Engineering Strategies in Preclinical Studies: A Systematic Review

Naiima Ahmed Omar¹, Joëlle Amédée¹, Didier Letourneur^{2,3}, Jean-Christophe Fricain^{1,4} and Mathilde Fenelon^{1,4*}

¹Université de Bordeaux, INSERM U1026, BIOTIS, Bordeaux, France, ²SILTISS, Saint-Viance, France, ³Université Paris Cité, Université Sorbonne Paris Nord, INSERM U1148, LVTS, X Bichat Hospital, Université de Paris, Paris, France, ⁴Service de Chirurgie Orale, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Adil Denizli,
Hacettepe University, Turkey

Reviewed by:

Jennifer Patterson,
Instituto IMDEA Materiales, Spain
Vikas Rana,
Punjabi University, India

*Correspondence:

Mathilde Fenelon
mathilde.fenelon@u-bordeaux.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Biomaterials,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 04 March 2022

Accepted: 23 May 2022

Published: 30 June 2022

Citation:

Ahmed Omar N, Amédée J,
Letourneur D,
Fricain J-C and Fenelon M (2022)
Recent Advances of Pullulan and/or
Dextran-Based Materials for Bone
Tissue Engineering Strategies in
Preclinical Studies: A
Systematic Review.
Front. Bioeng. Biotechnol. 10:889481.
doi: 10.3389/fbioe.2022.889481

Bone tissue engineering (BTE) strategies are increasingly investigated to overcome the limitations of currently used bone substitutes and to improve the bone regeneration process. Among the natural polymers used for tissue engineering, dextran and pullulan appear as natural hydrophilic polysaccharides that became promising biomaterials for BTE. This systematic review aimed to present the different published applications of pullulan and dextran-based biomaterials for BTE. An electronic search in Pubmed, Scopus, and Web of Science databases was conducted. Selection of articles was performed following PRISMA guidelines. This systematic review led to the inclusion of 28 articles on the use of pullulan and/or dextran-based biomaterials to promote bone regeneration in preclinical models. Sixteen studies focused on dextran-based materials for bone regeneration, six on pullulan substitutes and six on the combination of pullulan and dextran. Several strategies have been developed to provide bone regeneration capacity, mainly through their fabrication processes (functionalization methods, cross-linking process), or the addition of bioactive elements. We have summarized here the strategies employed to use the polysaccharide scaffolds (fabrication process, composition, application usages, route of administration), and we highlighted their relevance and limitations for BTE applications.

Keywords: pullulan, dextran, bone tissue engineering, natural polymers, polysaccharides, bone regeneration

1 INTRODUCTION

Improving bone regeneration after traumatic injuries, pathologies, or tumors resection has been and still remains a surgical challenge since decades. To date, autologous bone grafting (Dimitriou et al., 2011; Lanza et al., 2014) is the gold standard technique for bone reconstruction, as it is induced by a non-immunogenic way, the properties required for bone regeneration [i.e., osteoinduction, osteoconduction, and osteogenesis (Dimitriou et al., 2011; Lanza et al., 2014)]. However, this method has some important drawbacks due to its limited availability and inherent complications from the surgical procedures (donor site injury and morbidity) (Dimitriou et al., 2011).

Bone tissue engineering (BTE) strategies have thus emerged to develop alternatives to conventional autologous bone graft reconstruction. BTE approach is usually based on a combination of scaffolds with cells and/or bioactive molecules to provide the conditions required for bone formation. Design of scaffolds that mimic the mechanical and structural features of bone extracellular matrix (Filippi et al., 2020) that is highlighted. Biomaterials for bone scaffolding applications are critical to enable cell viability and proliferation, osteodifferentiation, angiogenesis, host integration, and when needed load bearing (Roseti et al., 2017; Kashirina et al., 2019). Calcium phosphate cements (CPC) such as hydroxyapatite (HA) or β -tricalcium phosphate (β -TCP) are thus the most commonly used scaffolds for BTE applications (Ana et al., 2018; Liang et al., 2021).

Recently, a number of natural polymers, such as chitosan, collagen, gelatin, hyaluronic acid, or alginate has gained an increasing interest (Tang et al., 2021). They often show biocompatibility, biodegradability, and share similar structures to the natural extracellular matrix (Filippi et al., 2020). An interesting property of polymeric scaffolds is their ability to be easily designed according to the desired three-dimensional structure, such as hydrogels, macroporous scaffolds, microspheres, or micro-molded matrices (Mallick and Cox, 2013; Wu et al., 2021). Polysaccharides are one type of natural polymers that are composed of molecules linked through a glycosidic linkage (Hussain et al., 2017). Among them, dextran and pullulan are both exopolysaccharides, which are secreted into the surrounding environment of microorganisms by cell wall-anchored enzymes (Hussain et al., 2017). They have already been used for medical research since they are biocompatible, biodegradable, and present no immunogenic reaction (Prajapati et al., 2013; Banerjee and Bandopadhyay, 2016). For example, dextran was used as plasma expander (Banerjee and Bandopadhyay, 2016), drug carrier to target organs [e.g., colon (Hovgaard and Brøndsted, 1995; Simonsen et al., 1995), skin (Sun et al., 2011)] or as a molecular imaging tracer for magnetic resonance imaging (Tassa et al., 2011; Banerjee and Bandopadhyay, 2016) (e.g., dextran-coated iron oxide nanoparticles). Pullulan-based materials have been used as an excipient in pharmaceutical tablets (Prajapati et al., 2013). Some researchers also focused on its potential as a plasma-blood substitute (Prajapati et al., 2013) like dextran derivatives, as a drug delivery system (Fundueanu et al., 2003) or as a fluorescent probe for medical imaging (Morimoto et al., 2005b).

The use of these two polysaccharides for BTE has thus been investigated to design biological scaffolds for bone regeneration. In the last decades, several studies focused on the production of pullulan and/or dextran-based scaffolds combined with CPC or growth factors, and investigated their potential for BTE. However, there is no report summarizing the development of pullulan and/or dextran-based bone materials, functionalization methods and their applications to promote bone regeneration. This review aims to identify the different strategies of pullulan and/or dextran-based substitutes for bone tissue engineering applications in preclinical studies since no clinical application were reported in the online search.

2 MATERIALS AND METHODS

This systematic review was performed according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (Moher et al., 2015). A protocol was specified and registered on the database International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) (registration number CRD42021220920) and is available from: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42021220920.

2.1 Focused Question

This systematic review was performed to address the following focused question: "What are the best strategies of using pullulan and/or dextran in bone regeneration in preclinical models?"

2.2 Search Strategy

An electronic search of the MedLine (PubMed), Embase (Scopus), and Web of science databases was carried out. Medical subject headings (MeSH) terms were combined with keywords and Boolean operators to search databases. All searches were performed from October 2020 to February 2022 by focusing on studies written in English or French and published between January 2000 and February 2022. The searching query used for the research was: ("pullulan" OR "dextran") AND ["bone (MeSH)" OR "bone regeneration (MeSH)"]. Additional articles were also searched by manually screening the list of references of all publications selected by the search.

2.3 Eligibility Criteria

Preclinical controlled trials using pullulan and/or dextran substitutes to induce bone regeneration were considered. All animal studies (all type, all sexes) were eligible if they assessed new bone formation in a bone defect or subcutaneously. *In vitro* studies, clinical trials and reviews were excluded.

2.4 Screening Methods and Data Extraction

Two independent reviewers (NA and MF) screened the titles and abstracts. For eligible studies that matched with the inclusion criteria, full texts were then assessed. Any disagreement between the reviewers over the eligibility of particular studies was resolved through discussion with a third reviewer (J-CF).

In order to extract relevant data from included studies, structurable tables were made with the following data: authors, animal models, type of defect or implantation site, conditions tested (with the number of defects created or scaffolds implanted), composition of the scaffolds, cross-linking reagents, adjuvants (e.g., growths factors, cell lines, mineralized molecules), material design, observation period, and experimental analysis with results. For any missing data, authors were contacted by e-mail to complete tables.

2.5 Quality Assessment and Analysis of the Data

Methodological quality of individual studies was assessed using the collaborative Evidence-Based Complementary and

TABLE 1 | Characterization of scaffold used in the included studies.

Author (Year)	Polysaccharide composition	Biocomposite scaffold (additional polymers and ceramics)	Functionalization of dextran, pullulan or pullulan/dextran scaffolds	Cross-linking process (cross-linker used)	Material aspect	Bioactive components
Lafont et al. (2004)	Dextran	—	Carboxymethyl, benzylamide and sulfate	—	Aqueous solution (loaded into collagen sponges)	—
Maire et al. (2005a)	Dextran	—	Carboxylate, benzylamide and sulfate (three different D.S. expressed in %: 0, 2, and 18)	Chemical cross-linking (STMP)	Hydrogel	BMP-2
Chen et al. (2005)	Dextran	Gelatin	—	Chemical cross-linking	Microspheres	BMP-2
Chen et al. (2006)	Dextran	Gelatin	Glycidyl methacrylate (three different D.S. referring to the number of methacrylated groups per 100 glucopyranose residues: 4.7, 6.3, and 7.8)	Chemical cross-linking (Polyethylene glycol)	Microspheres	IGF-1
Chen et al. (2007)	Dextran	Gelatin	Glycidyl methacrylate	Chemical cross-linking	Hydrogel	—
	Dextran	Polyethylene glycol	Glycidyl methacrylate	Chemical cross-linking	Microspheres	BMP-2
Degat et al. (2007)	Dextran	—	Carboxymethyl, benzylamide	—	Aqueous solution (loaded into collagen sponges)	BMP-2
Abbah et al. (2012)	Dextran/Alginate	—	Diethylaminoethyl	Physical cross-linking (CaCl ₂)	Microspheres (loaded into polymeric sponges)	BMP-2
Bölgén et al. (2013)	Dextran	Hydroxyethyl methacrylate Lactate	—	Chemical cross-linking (Methylenebisacrylamide)	Cryogel (disc-shaped)	MSCs
Togami et al. (2014)	Dextran	Polyvinyl formal	—	—	Sponges	—
Ritz et al. (2018)	Dextran	—	Carboxymethyl and epoxy benzophenone	Chemical cross-linking (UV radiation)	Hydrogel (disc-shaped)	BMP-7 SDF-1 HUVEC hOB BMP-2
Chen et al. (2019)	Dextran	—	Sulfate	—	Aqueous solution (loaded into gelatin sponges)	BMP-2
Ding et al. (2019)	Dextran/Chitosan	Strontium-doped HA	Formylbenzoic	Chemical cross-linking	Hydrogel (injected, <i>in situ</i> forming)	—
Fang et al. (2019)	Dextran	Polyacrylamide HA	Urethane methacrylate	Physical cross-linking (SDS/SMA micelles)	Hydrogel (disc-shaped)	—
Shoji et al. (2020)	Dextran	—	Tyramine	Chemical cross-linking (H ₂ O ₂ , HRP)	Hydrogel (injected, <i>in situ</i> forming)	bFGF
Yu et al. (2020)	Dextran	—	—	—	Aqueous solution (loaded into gelatin sponges)	BMP-2
Wang et al. (2021)	Dextran	PLGA HA	Aldehyde and catechol	Chemical cross-linking (Schiff reaction)	Hydrogel (injected, <i>in situ</i> forming)	Bisphosphonate
Hayashi et al. (2009)	Pullulan	—	Cholesteryl and acryloyl	Chemical cross-linking (thiol-bearing polyethylene glycol)	Hydrogel (hemisphere-shaped)	BMP-2
Miyahara et al. (2011)	Pullulan	—	Cholesteryl and acryloyl	Chemical cross-linking (thiol-bearing polyethylene glycol)	Hydrogel (membrane)	—
Fujioka-Kobayashi et al. (2012)	Pullulan	—	Cholesteryl and acryloyl	Chemical cross-linking (thiol-bearing polyethylene glycol)	Hydrogel (disc-shaped)	BMP-2 and/or FGF18
Takahata et al. (2015)	Pullulan	β-TCP	Phosphate	—	NS	—
Charoenlarp et al. (2018)	Pullulan	—	Cholesteryl and acryloyl	Chemical cross-linking (thiol-bearing polyethylene glycol and/or RGD peptides)	Hydrogel (disc-shaped)	BMP-2 and FGF18
Popescu et al. (2019)	Pullulan/Alginate	Bioglass containing X%CuO (X = 0.5 or 1.5)	—	—	NS	—

(Continued on following page)

TABLE 1 | (Continued) Characterization of scaffold used in the included studies.

Author (Year)	Polysaccharide composition	Biocomposite scaffold (additional polymers and ceramics)	Functionalization of dextran, pullulan or pullulan/dextran scaffolds	Cross-linking process (cross-linker used)	Material aspect	Bioactive components
Fricain et al. (2013)	Pullulan/Dextran	HA	—	Chemical cross-linking (STMP)	Hydrogel (sponges)	—
Schlaubitz et al. (2014)	Pullulan/Dextran	HA	—	Chemical cross-linking (STMP)	Microspheres	—
Frasca et al. (2017)	Pullulan/Dextran	—	—	Chemical cross-linking (STMP)	Hydrogel (sponges)	MSCs
Ribot et al. (2017)	Pullulan/Dextran	HA and/or fucoidan	—	Chemical cross-linking (STMP)	Microspheres	—
Fricain et al. (2018)	Pullulan/Dextran	HA	—	Chemical cross-linking (STMP)	Microspheres	—
Maurel et al. (2021)	Pullulan/Dextran	HA	—	Chemical cross-linking (STMP)	Microspheres	—

bFGF, basic fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; β -TCP, beta-tricalcium phosphate; CuO, copper oxide; D.S., degree of substitution; FGF, fibroblast growth factor; HA, hydroxyapatite; HEMA, hydroxyethyl methacrylate; H_2O_2 , hydrogen peroxide; hOB, human osteoblast; HRP, horseradish peroxidase; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IGF, insulin-like growth factor; MSCs, mesenchymal stromal cells; NS, not specified; PEG, polyethylene glycol; PLGA, poly-(L-glutamic acid); RGD, arginine-glycine-aspartate; SDF-1, stromal-derived growth factor; SDS, sodium dodecyl sulfate; SMA, stearyl methacrylate; STMP, sodium trimetaphosphate; (—), not applicable.

Alternative Medicine approach to meta-analysis and review of animal data in experimental infarction (CAMARADES) 10-item quality checklist (Macleod et al., 2004) and SYRCL's risk of bias tool (Hooijmans et al., 2014). These tools enabled to build a modified checklist by using eight items for relevance: 1) Peer reviewed publication; 2) Control of the temperature in the animal facilities; 3) Random allocation to treatment or control; 4) Blinded assessment of outcomes; 5) Animal model description; 6) Sample size calculation; 7) Compliance with animal welfare regulation; 8) Statement of potential conflict of interest. Data analysis was then performed in a descriptive way since the information obtained did not enable meta-analyses.

3 RESULTS

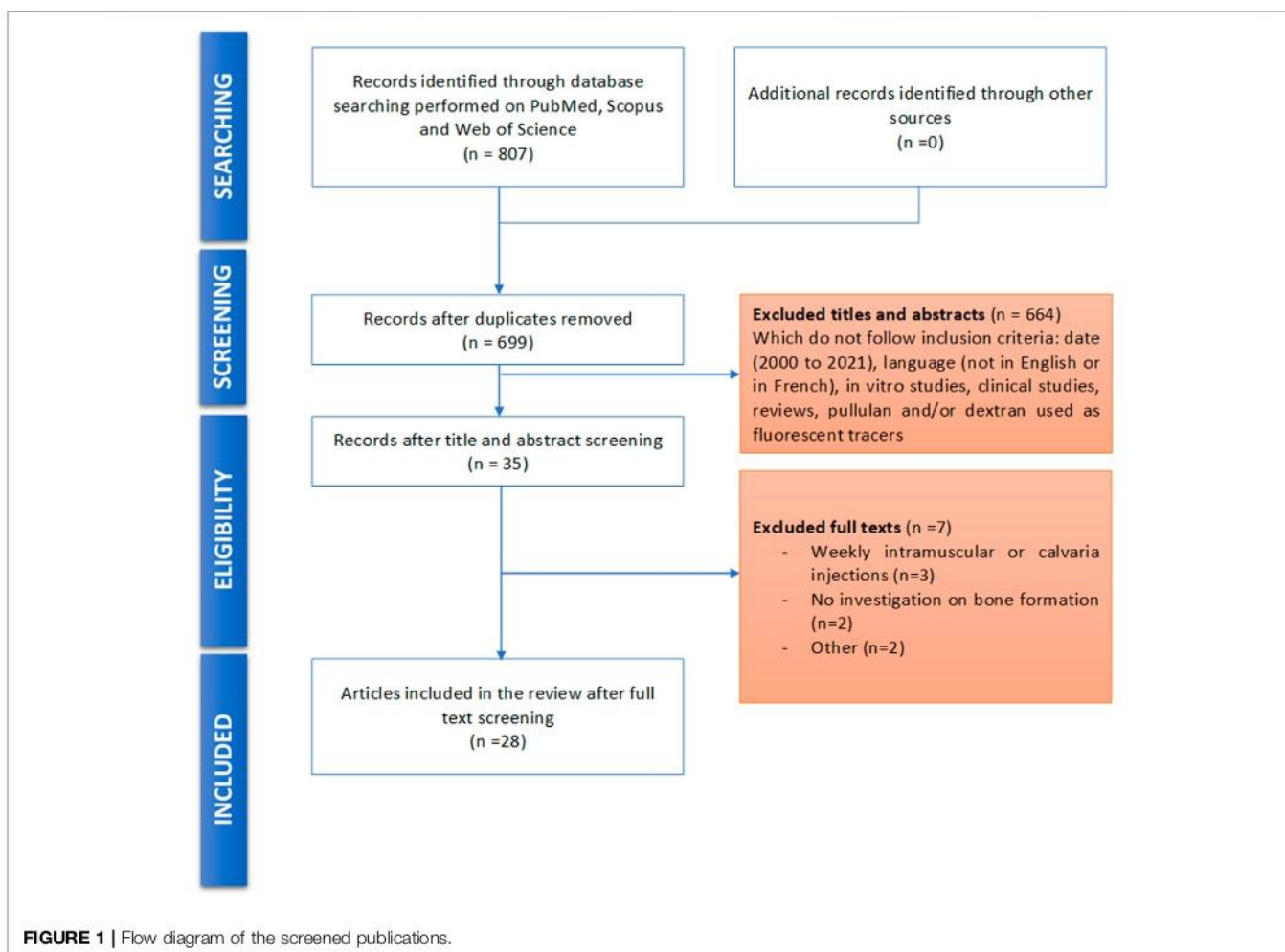
3.1 Search Outcomes

Database screening yielded to 713 publications after duplicates removal. Among these publications, 35 articles were selected for potential inclusion after title and abstract reading. Full texts of these 35 articles were reviewed. Seven of the 35 studies were excluded for not meeting the inclusion criteria. No additional study was added for selection after manually screening the list of references of selected publications. Finally, 28 studies were included for this systematic review: 16 used dextran-derived biomaterials (Lafont et al., 2004; Maire et al., 2005a; Chen et al., 2005; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Degat et al., 2009; Abbah et al., 2012; Bölgen et al., 2014; Ritz et al., 2018; Chen et al., 2019; Ding et al., 2019; Fang et al., 2019) for bone regeneration, six used pullulan-derived biomaterials (Hayashi et al., 2009; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Miyahara et al., 2012; Takahata et al., 2015; Charoenlarp et al., 2018; Popescu et al., 2020) and six used a combination of these two polysaccharides (Fricain et al., 2013; Fricain et al., 2018; Schlaubitz et al., 2014; Frasca et al., 2017; Ribot et al., 2017)

(Table 1). A flowchart of the selection and inclusion process, based on PRISMA recommendations is presented in Figure 1. Risk of bias ranged from low to high and detailed results of methodological quality are presented in Figures 2, 3. Sample size calculation and blinded assessment of outcomes showed the highest risk of bias.

3.2 Experimental Models

Most studies (25 out of 28 studies) were carried out on small animals (e.g., mice, rats, rabbits), and only few studies investigated bone formation in larger animal models (e.g., pigs, sheeps, goats, and dogs). Experimental procedures were performed ectopically (17%), or orthotopically (83%) (Figure 4). Ectopic bone formation was investigated in six studies using subcutaneous implantation in the back of animals or by muscular implantation (e.g., leg muscles) (Table 2) (Maire et al., 2005a; Degat et al., 2009; Hayashi et al., 2009; Fricain et al., 2013; Chen et al., 2019; Yu et al., 2020). Orthotopic implantations were mainly performed on maxillofacial defects and long bone defects (Tables 3, 4, 5) (Lafont et al., 2004; Chen et al., 2005; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Hayashi et al., 2009; Abbah et al., 2012; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Miyahara et al., 2012; Fricain et al., 2013; Bölgen et al., 2014; Schlaubitz et al., 2014; Takahata et al., 2015; Togami et al., 2015; Frasca et al., 2017; Ribot et al., 2017; Charoenlarp et al., 2018; Fricain et al., 2018; Ritz et al., 2018; Ding et al., 2019; Fang et al., 2019; Popescu et al., 2020; Shoji et al., 2020; Maurel et al., 2021; Wang et al., 2021). Nine studies investigated calvarial defects, six studies focused on mandibular or maxillary defects (e.g., periodontal, sinus bone augmentation), whereas 10 studies were performed on femoral defects (e.g., condyle, epiphysis, metaphysis), one study on ulnar defect and one study on tibial defect. Two studies assessed vertebral bone defects regeneration. Bone formation was investigated radiographically mainly using micro-computed tomography (micro-CT) and/or by histological analysis.



3.3 Polysaccharide-Based Materials

Among the 28 studies included, 24 used either dextran or pullulan as the main component for biomaterial design (Lafont et al., 2004; Chen et al., 2005; Maire et al., 2005a; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Degat et al., 2009; Hayashi et al., 2009; Abbah et al., 2012; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Miyahara et al., 2012; Bölgen et al., 2014; Takahata et al., 2015; Charoenlarp et al., 2018; Ritz et al., 2018; Chen et al., 2019; Ding et al., 2019; Fang et al., 2019; Popescu et al., 2020) and six used a combination of these two polysaccharides (Fricain et al., 2013; Schlaubitz et al., 2014; Frasca et al., 2017; Ribot et al., 2017; Fricain et al., 2018) (Table 1). In most cases, when pullulan or dextran was used alone, chemical functionalization of the polysaccharide was performed to improve the cross-linking process and/or to promote their binding capacity to growth factors. For dextran derivatives, acrylate groups (Chen et al., 2006; Chen et al., 2007) (e.g., glycidyl methacrylate, urethane methacrylate), amine or amide derivatives (Lafont et al., 2004; Maire et al., 2005a; Degat et al., 2009; Abbah et al., 2012; Shoji et al., 2020) (e.g., benzylamide, diethylaminoethyl, tyramine), carboxyl (Lafont et al., 2004; Degat et al., 2009; Ritz et al., 2018) (e.g., carboxylate, carboxymethyl, formylbenzoic), aldehyde (Wang et al., 2021), catechol (Wang et al., 2021) (i.e., dopamine), or sulfated groups (Chen et al., 2019)

were added to the dextran backbone in 11 studies. Concerning pullulan derivatives, acrylate groups (Hayashi et al., 2009; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Miyahara et al., 2012; Charoenlarp et al., 2018) (e.g., acryloyl, cholesteryl) or phosphate groups (Takahata et al., 2015) were added for functionalization in five studies. No chemical modification was reported for compositions using both polysaccharides (Fricain et al., 2013; Schlaubitz et al., 2014; Frasca et al., 2017; Ribot et al., 2017; Fricain et al., 2018; Maurel et al., 2021).

Physical cross-linking and chemical cross-linking were used for hydrogels (Kumari and Badwaik, 2019). Physically cross-linked of dextran-derived biomaterials were identified in two studies by using ionic cross-linking [e.g., calcium chloride (Abbah et al., 2012)] or by micellar reaction [e.g., sodium dodecyl sulfate/stearyl methacrylate (Fang et al., 2019) (SDS/SMA) micelles]. Chemical cross-linking was the most commonly used procedure. For chemically cross-linked dextran and/or pullulan-derived biomaterials, a wide range of reagents and reactions were employed, such as methylenebisacrylamide (Bölgen et al., 2014) (MBAm), polyethylene glycol (Chen et al., 2006) (PEG), thiol group-modified polyethylene glycol (Hayashi et al., 2009; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Miyahara et al., 2012; Charoenlarp et al., 2018) (PEGSH), PEGSH with “arginine-glycine-aspartate”

Study	Risk of bias							
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
Lafont J. (2004)	+	-	X	X	+	X	+	+
Maire M. (2005)	+	-	X	X	+	X	+	+
Chen F. (2005)	+	-	X	X	+	X	+	+
Chen F. (2006)	+	-	+	-	+	X	+	+
Chen F. (2007)	+	-	+	-	+	X	+	+
Degat M.-C. (2007)	+	-	-	-	+	X	+	+
Abbah S.-A. (2012)	+	-	X	X	+	X	+	+
Bölgen N. (2013)	+	-	-	-	+	X	+	+
Togami W. (2014)	+	-	X	X	+	X	+	+
Ritz U. (2018)	+	-	-	-	+	X	+	+
Chen H. (2019)	+	-	+	-	+	X	+	+
Ding X. (2019)	+	-	+	-	+	X	+	+
Fang J. (2019)	+	-	X	X	+	X	+	+
Shoji S. (2020)	+	+	-	-	+	X	+	+
Yu Y. (2020)	+	-	-	-	+	X	+	+
Wang W. (2021)	+	-	+	-	+	X	+	+
Hayashi C. (2009)	+	-	X	-	+	X	+	+
Miyahara T. (2011)	+	+	-	-	+	X	+	+
Fujioka-Kobayashi M. (2012)	+	-	X	X	+	X	+	+
Takahata T. (2015)	+	+	+	+	+	X	+	+
Charoenlarp P. (2018)	+	-	-	+	+	X	+	+
Popescu R. (2019)	+	+	X	X	+	X	+	+
Fricain J.-C. (2013)	+	-	X	X	+	X	+	+
SchlaubitZ S. (2014)	+	-	-	-	+	X	+	+
Frasca S. (2017)	+	-	-	-	+	X	+	+
Ribot E. J. (2017)	+	-	-	-	+	X	+	+
Fricain J.-C. (2018)	+	-	+	-	+	X	+	+
Maurel D. (2021)	+	-	+	-	+	X	+	+

D1: Peer reviewed publication
D2: Control of the temperature
D3: Random allocation to treatment or control
D4: Blinded assessment of outcomes
D5: Animal model description
D6: Sample size calculation
D7: Compliance with animal welfare regulation
D8: Statement of potential conflict of interest



Judgement
 High
 Unclear
 Low

FIGURE 2 | Quality assessment of each included study using a modified CAMARADES checklist.

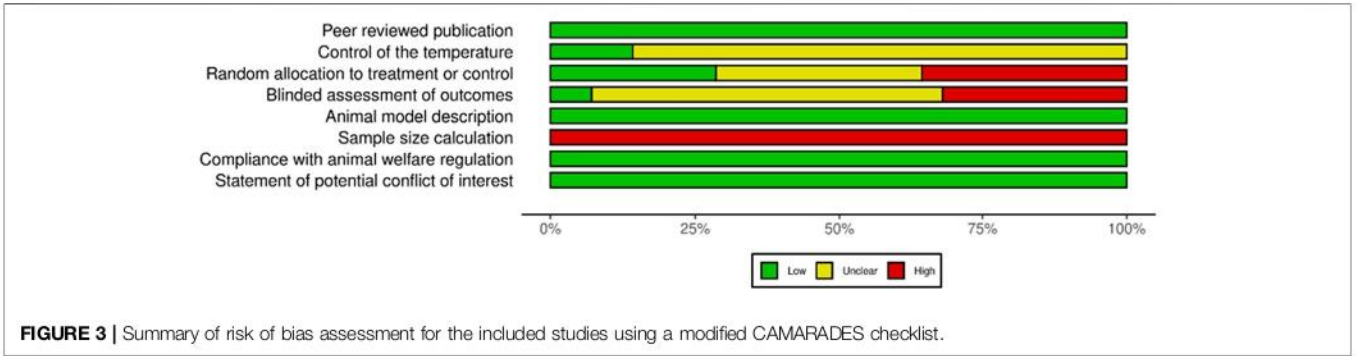


FIGURE 3 | Summary of risk of bias assessment for the included studies using a modified CAMARADES checklist.

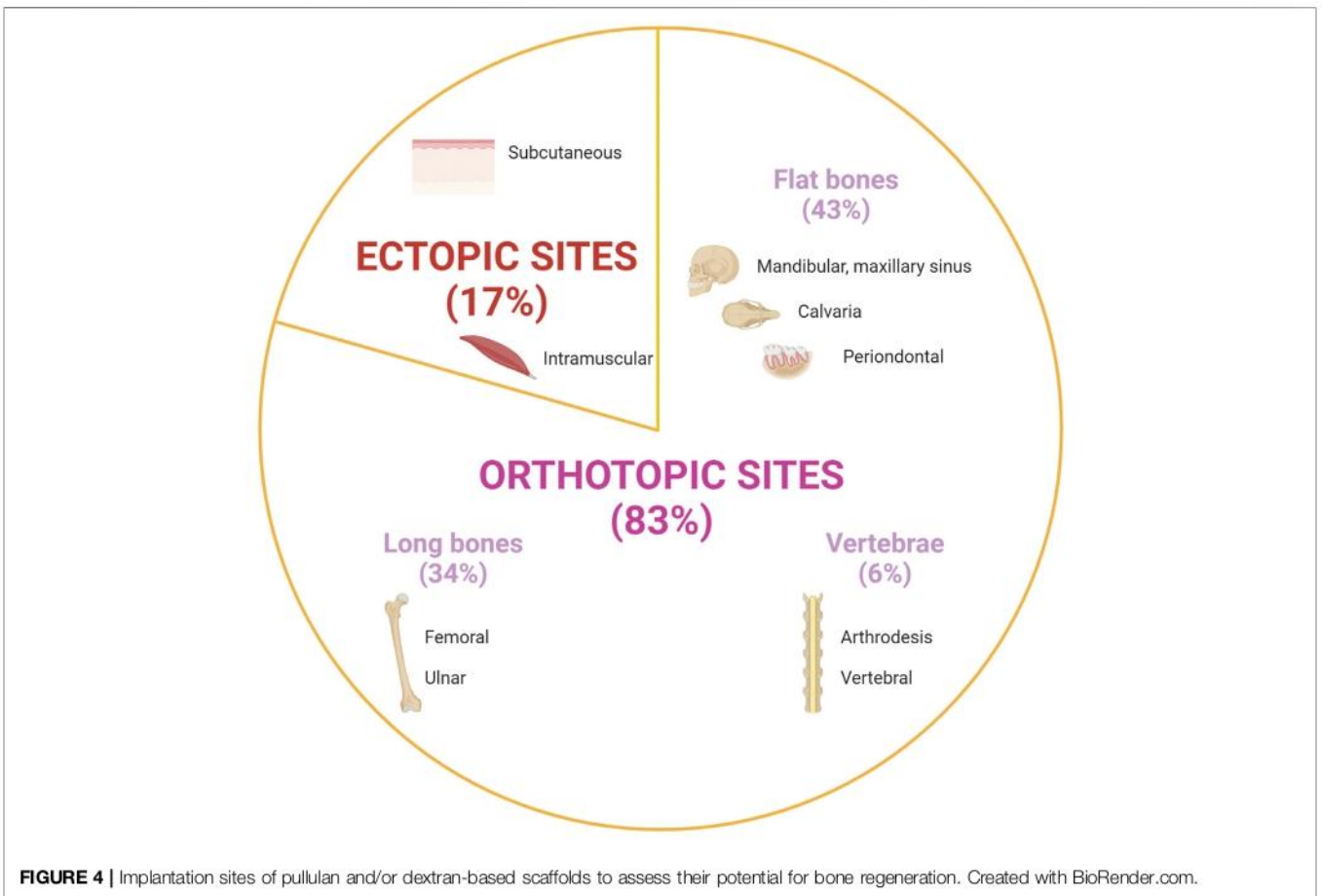


FIGURE 4 | Implantation sites of pullulan and/or dextran-based scaffolds to assess their potential for bone regeneration. Created with BioRender.com.

(RGD) peptides (Charoenlarp et al., 2018), sodium trimetaphosphate (Maire et al., 2005a; Fricain et al., 2013; Schlaubitz et al., 2014; Frasca et al., 2017; Ribot et al., 2017; Fricain et al., 2018; Maurel et al., 2021) (STMP), through Schiff reaction (imine bonding) (Wang et al., 2021), through enzymatic reaction (Shoji et al., 2020) (e.g., hydrogen peroxide, horseradish peroxidase) or by activating a photocross-linking group using UV light (Ritz et al., 2018).

We have identified three main routes of administration of these biomaterials in implantation sites. They could be implanted as an injectable hydrogel or microspheres/

microbeads (e.g., dextran and/or pullulan-derived biomaterials), as an aqueous solution adsorbed on a collagen or a polyvinyl alcohol sponge [e.g., dextran-derived biomaterials (Lafont et al., 2004; Degat et al., 2009; Togami et al., 2015; Chen et al., 2019; Yu et al., 2020)] or as a membrane for guided bone regeneration [e.g., pullulan-derived biomaterial (Miyahara et al., 2012)].

To induce or enhance bone formation, various elements were directly added in these scaffolds to generate composite scaffolds (Figure 5). Bioceramics, such as hydroxyapatite (HA) (Fricain et al., 2013; Schlaubitz et al., 2014; Ribot et al., 2017; Fricain et al.,

TABLE 2 | Preclinical studies using Dextran and/or Pullulan scaffold in ectopic sites.

Author (Year)	Animal model (sex; species); n, number of animals used	Implantation site, dimension of the implanted material	Conditions (N, number of total implanted materials per condition)	Observation time [in day (D), week (W) or month (M)]	Experimental analysis	Results
Maire et al. (2005b)	Rat (male, Sprague Dawley), n = 21	Muscle implantation (back) Collagen sponge Diameter: 7 mm Height: 7 mm	1: BMP (N = 20) 2: Dextran (DS 0%) + BMP (N = 14) 3: Dextran (DS 2%) + BMP (N = 14) 4: Dextran (DS 18%) + BMP (N = 14)	7 W	2D X-ray (qualitative analysis) Stevenel blue and Van Gieson Picrofuschin staining (Bone formation); Von Kossa staining (qualitative analysis)	Dextran (DS 18%) + BMP showed large radiopaque areas compared to other groups (no statistical significance due to heterogeneity within the same group) For Dextran (DS 18%) + BMP group, bone formation occurred through endochondral ossification or by intramembranous ossification
Degat et al. (2007)	Rat (male, Sprague Dawley), n = 24	Subcutaneous (back) Collagen sponge Diameter: 3 mm Height: 2 mm	1: BMP-2 (N = 6) 2: Dextran (1 µg) + BMP-2 (N = 6) 3: Dextran (10 µg) + BMP-2 (N = 6) 4: Dextran (100 µg) + BMP-2 (N = 6)	4 W	Calcium mass (µg/implant)	Dextran (10 µg) + BMP-2 ** > BMP-2 BMP-2 * > Dextran (100 µg) + BMP-2
Chen et al. (2019)	Mouse (male, C57BL/6), n = 3	Muscle implantation (leg) Gelatin sponge size Length: 0.5 cm Width: 0.5 cm Height: 0.3 cm	1: BMP-2 (N=NS) 2: Chitosan + BMP-2 (N=NS) 3: Dextran + BMP-2 (N=NS) 4: PSS + BMP-2 (N=NS)	2 W 4 W	Wet and ash weights of ectopic bone (g) Masson's Trichrome staining (qualitative analysis)	No significant difference observed between Dextran + BMP-2 and BMP-2 alone groups Dextran + BMP-2 less bone formation compared to other groups
Yu et al. (2020)	Mouse (male, C56BL/6), n = 40	Muscle implantation (leg) Gelatin sponge size: NS	1: BMP-2 (10 µg) (N = 16) 2: BMP-2 (15 µg) (N = 16) 3: Heparin + BMP-2 (N = 16) 4: Chitosan + BMP-2 (N = 16) 5: Dextran + BMP-2 (N = 16)	2 W 4 W	Micro-CT (BVf in %) Masson's Trichrome staining; TRAP+ staining (qualitative analysis)	No significant difference between groups At 4W: for Dextran + BMP-2 group, traces of trabecular bone and bone resorption occurred
Hayashi et al. (2009)	Mouse (male, ICR), n = NS	Muscle implantation (leg) Diameter: 2.5 mm Height: NS	1: Pullulan (N = 3-4) 2: Pullulan + BMP-2 (2 µg) (N = 3-4)	3 W	Micro-CT (BV in mm ³)	No significant difference between Pullulan and Pullulan + BMP-2 group
Fricain et al. (2013)	Mouse (NS, Balb/c), n = NS Goat (NS) n = 7	Subcutaneous (back) Diameter: 4 mm Height: 4 mm Muscle implantation (back) Diameter: 10 mm Depth: 10 mm	1: Pullulan/Dextran (N = 6) 2: Pullulan/Dextran + HA (N = 6) 1: Pullulan/Dextran (N = 12) 2: Pullulan/Dextran + HA (N = 12)	15 D 30 D 60 D 1 M 6 M	Micro-CT (MC in mg; MD in mg/cm ³) Enzyme Immunoassay for BMP-2 (pg/mg protein) Micro-CT (qualitative analysis) Von Kossa staining; Masson's Trichrome staining (qualitative analysis)	Pullulan/Dextran + HA ** > Pullulan/Dextran Pullulan/Dextran + HA * > Pullulan/Dextran Osteoid tissue formation for Pullulan/Dextran + HA group Osteoid tissue formation for Pullulan/Dextran + HA group

BMP, bone morphogenetic protein; BV, bone volume; BVF, bone volume fraction; D.S., degree of substitution; HA, hydroxyapatite; MC, mineral content; MD, mineral density; NS, not specified; PSS, poly (sodium-p-styrenesulfonate); * p < 0.05; ** p < 0.01.

TABLE 3 | Preclinical studies using Dextran scaffolds for bone regeneration in orthotopic sites.

Author (Year)	Animal model (sex; species); n, number of animals used	Type of defect (defect size)	Conditions (N, number of defects created in total per condition)	Observation time [in day (D), week (W) or month (M)]	Experimental analysis	Results
Lafont et al. (2004)	Rat (male, Wistar), n = 98	Calvaria Ø: 5 mm	1: PBS (N = 49) 2: Dextran (N = 49)	1 D 2 D 3 D 4 D 5 D 6 D 7 D	2D x-ray analysis (Bone Repair in %) Toluidine blue staining (ALP staining, qualitative analysis)	At 7D: Dextran *** > PBS For Dextran group: at 5D, bone formation began at the edges of the defect and bone nodules appeared at 6D
Chen et al. (2005)	Dog (female, Beagle), n = 12	Periodontal class III furcation (2nd, 3rd and 4th premolars) H: 5 mm	1: CPC covered by Simple Membrane (N = 33) 2: CPC + BMP-2 covered by Simple Membrane (N = 32) 3: Dextran/Gelatin + BMP-2 in CPC covered by Functionalized Membrane (N = 34)	8 W	HE staining (New bone area in %)	Dextran/Gelatin + BMP-2 ** > CPC
Chen et al. (2006)	Dog (male, Beagle), n = 12	Periodontal class III furcation (2nd and 3rd molars) H: 5 mm	1: Empty (N = 16) 2: Dextran (D.S. = 6.3)/Gelatin (N = 16) 3: IGF-1 (N = 16) 4: Dextran (D.S. = 4.7)/Gelatin + IGF-1 (N = 16) 5: Dextran (D.S. = 6.3)/Gelatin + IGF-1 (N = 16) 6: Dextran (D.S. = 7.8)/Gelatin + IGF-1 (N = 16)	4 W 8 W	2D X-Ray (qualitative analysis) HE staining; Modified Mallory's Trichrome staining (Morphometric analysis of new bone in %)	For Dextran/Gelatin containing IGF groups, new bone formation was observable Dextran (D.S. = 4.7)/Gelatin + IGF-1 * > Dextran (D.S. = 7.8)/Gelatin + IGF-1
Chen et al. (2007)	Dog (male, Mongrel), n = 6	Periodontal class III furcation (2nd and 3rd premolars) H: 5 mm	1: Dextran/Gelatin (N = 16) 2: Dextran/Gelatin + microsphere BMP (N = 16) 3: Dextran/Gelatin + aqueous BMP (N = 16)	8 W	Modified Mallory's Trichrome staining (Height of new bone regenerated in mm; % of regenerated new bone)	Dextran/Gelatin + microsphere BMP ** > Dextran/Gelatin + aqueous BMP * > Dextran/Gelatin
Abbah et al. (2012)	Rat (male, Sprague Dawley), n = 38	Arthrodesis (iliac bone L3, L4 fusion) Bioresorbable mPCL-TCP scaffold L: 4 mm W: 4 mm H: 4 mm	1: Empty (N = 6) 2: Alginate + BMP-2 (N = 8) 3: PLO + BMP-2 (N = 8) 4: PLA + BMP-2 (N = 8) 5: DEAE-Dextran + BMP-2 (N = 8)	6 W	Micro-CT (BVF in %) Masson's Trichrome staining (qualitative analysis)	PLA + BMP-2 ** > DEAD-Dextran + BMP-2 DEAD-Dextran: new bone tissue was thin and sparse
Bölgen et al. (2013)	Rat (NS, Sprague Dawley), n = 57	Calvaria Ø: 8 mm	1: HEMA/Lactate/Dextran (N = 29) 2: HEMA/Lactate/Dextran + MSCs (N = 28)	30 D 90 D 180 D	HE staining; Masson's Trichrome staining (New bone/Total cavity ratio)	At 180D: HEMA/Lactate/Dextran > HEMA/Lactate/Dextran + MSCs *

(Continued on following page)

2018; Ding et al., 2019; Fang et al., 2019; Maurel et al., 2021; Wang et al., 2021), β -tricalcium phosphate (Takahata et al., 2015) (β -TCP) or bioactive glass (Popescu et al., 2020) were thus added to the scaffolds in nine studies, whereas another natural or synthetic

polymer was combined to the scaffold in nine studies (Chen et al., 2005; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Abbah et al., 2012; Togami et al., 2015; Ding et al., 2019; Fang et al., 2019; Popescu et al., 2020; Wang et al., 2021).

TABLE 3 | (Continued) Preclinical studies using Dextran scaffolds for bone regeneration in orthotopic sites.

Author (Year)	Animal model (sex; species); n, number of animals used	Type of defect (defect size)	Conditions (N, number of defects created in total per condition)	Observation time [in day (D), week (W) or month (M)]	Experimental analysis	Results
Togami et al. (2014)	Rabbit (male, Japanese) n = 9	Femoral (epiphysis) Ø: 4 mm H: 10 mm	1: PVF/Dextran without water holding capability (N = 9) 2: PVF/Dextran with water holding capability (N = 9)	2 W 4 W 6 W	Micro-CT (BV/TV in %; BMD in mg/cm ³) HE staining (Ratio of bone formation per area in %)	At 4W and 6W: PVF/Dextran water holding capability ** > PVF/Dextran without water holding capability PVF/Dextran water holding capability > PVF/Dextran without water holding capability *** Newly trabecular bone with lamellar structures for PVF/Dextran water holding capability
Ritz et al. (2018)	Mouse (NS, Athymic nude), n = 40	Calvaria Ø: 2.7 mm	1: Empty (N = 2) 2: Dextran (N = 16) 3: Dextran + HUVEC (N = 16) 4: Dextran + HUVEC/hOB (N = 14) 5: Dextran + SDF-1 (N = 16) 6: Dextran + BMP-7 (N = 16)	8 W	Micro-CT (BV/TV in Voxel) HE staining (qualitative analysis)	Dextran + HUVEC * > Empty Dextran + SDF-1 * > Empty For Dextran + HUVEC or SDF-1 groups: fibrous membrane structure complemented by a thin bony structure covering the whole defect
Ding et al. (2019)	Rat (NS, Sprague Dawley), n = 24	Calvaria Ø: 5 mm	1: Chitosan/Dextran (N = 6) 2: Chitosan/Dextran + HA (N = 6) 3: Chitosan/Dextran + Sr50HA (N = 6) 4: Chitosan/Dextran + Sr100HA (N = 6)	4 W 8 W	Micro-CT (BV/TV in %) HE staining (New bone area fraction in %); Masson's Trichrome staining (Regenerated collagen in %)	Chitosan/Dextran + Sr100HA* > Chitosan/Dextran + HA * > Chitosan/Dextran Chitosan/Dextran + Sr100HA * > Chitosan/Dextran
Fang et al. (2019)	Rabbit (female, New Zealand), n = 18	Femoral (condyle) Ø: 3 mm H: 5 mm	1: Dextran/Polyacrylamide (N = 18) 2: Dextran/Polyacrylamide + HA (N = 18)	0 D 30 D 90 D	Micro-CT (BMC in mg; BV in mm ³) HE staining; Masson's Trichrome staining (qualitative analysis)	At 30D: HA-Dextran/ Polyacrylamide ** > Dextran/ Polyacrylamide At 30D: HA-Dextran/ Polyacrylamide groups sowed osteoid tissue formation which was not observed without HA
Shoji et al. (2020)	Mouse (NS, C57BL/6J), n = NS	Femur fracture L: 10 mm W: 4 mm	1: Empty (N=NS) 2: Dextran + PBS (N = 8) 3: Dextran + bFGF (N = 8)	4 W	Micro-CT (BV in mm ³ ; BMC in mg) HE staining (qualitative analysis)	Dextran + bFGF * > Empty Large calluses and newly formed bone at fracture site for Dextran + bFGF group
Wang et al. (2021)	Rats (female, Sprague Dawley) n = 18	Calvaria Ø: 4 mm	1: Empty (N = 9) 2: Dextran/PLGA + HA + BP (N = 9)	4 W 8 W 12 W	Micro-CT (BVF in %; BMD in g/cc; trabecular number in mm ⁻¹) HE staining; Toluidine blue staining (qualitative analysis)	Dextran/PLGA + HA + BP * > Empty At 8W: for Dextran/PLGA + HA + BP group, large area of woven bone and thin lamellar structure

BMC, bone mineral content; BMD, bone mineral density; BMP, bone morphogenic protein; BP, bisphosphonate; BV, bone volume; BV/TV, bone volume over total volume; β -TCP, beta-tricalcium phosphate; BVF, bone volume fraction; CPC, calcium phosphate ceramic; DEAE, diethylaminoethyl; D.S., degree of substitution; H, height; HA, hydroxyapatite; HE, hematoxylin and eosin; HEMA, hydroxyethyl methacrylate; hOB, human osteoblast; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; L, length; MC, mineral content; MD, mineral density; Micro-CT, micro-computed tomography; mPCL-TCP, medical grade poly (ϵ -caprolactone)- β -tricalcium phosphate; MSCs, mesenchymal stromal cells; n/s not significant; NaCl, sodium chloride; PBS, phosphate buffer saline; PLA, poly-L-arginine; PLO, poly-L-ornithine; PVF, polyvinyl formol; Sr, strontium; W, width * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ø, diameter.

TABLE 4 | Preclinical studies using Pullulan scaffolds for bone regeneration in orthotopic sites.

Author (Year)	Animal model (sex; species); n, number of animals used	Type of defect (defect size)	Conditions (N, number of defects created in total per condition)	Observation time [in day (D), week (W) or month (M)]	Experimental analysis	Results
Hayashi et al. (2009)	Mouse (male, ICR), n = NS	Calvaria implantation (without defect) Ø: 4.6 mm H: NS	1: Pullulan (N=NS) 2: Pullulan + BMP-2 (0.1 µg) (N=NS) 3: Pullulan + BMP-2 (1 µg) (N=NS) 4: Pullulan + BMP-2 (1.5 µg) (N=NS) 4: Pullulan + BMP-2 (2 µg) (N=NS)	14 D	Micro-CT (BV in mm ³)	No significant difference between groups
	Mouse (male, ICR), n = NS	Calvaria Ø: 4.6 mm H: NS	1: Empty (N=NS) 2: Pullulan (N=NS) 3: Pullulan + BMP-2 (1 µg) (N=NS) 4: Pullulan + BMP-2 (2 µg) (N=NS)	4 W	HE staining; Von Kossa staining (qualitative analysis) Micro-CT (qualitative analysis) HE staining (qualitative analysis)	Pullulan + BMP-2 stimulation of osteoblast activity to form new bone Pullulan alone failed to repair bone defect Pullulan + BMP-2 (2 µg) full repair of bone defect New bone formation at the edges of the defect for Pullulan + BMP-2 groups
Miyahara et al. (2011)	Rat (NS, Wistar), n = 36	Calvaria Ø: 5 mm H: NS	1: Empty (N = 24) 2: Collagen membrane (N = 24) 3: Pullulan membrane (N = 24)	2 W 4 W 8 W	Micro-CT (BV in mm ³) HE staining (qualitative analysis)	At 4W: Pullulan membrane * > Collagen membrane Collagen membrane: immature bone synthesized on both sides of the membrane Pullulan membrane: Mature bone synthesized; regeneration occurred under the membrane
		Calvaria Ø: 3 mm H: 5 mm	1: Pullulan + PBS (N = 11) 2: Pullulan + FGF18 (N = 10) 3: Pullulan + BMP-2 (N = 11) 4: Pullulan + FGF18 + BMP-2 (N = 11)	0 W 1 W 2 W 3 W 6 W 8 W	Micro-CT (Bone healing in %) Alizarin Red and Calcein staining (qualitative analysis)	At 8W: Pullulan + FGF18 + BMP-2 * > Pullulan + BMP-2
		Calvaria Ø: 3 mm H: NS	1: Pullulan-Rh + PBS (N = 3) 2: Pullulan-Rh + FGF18 + BMP-2 (N = 3)	2 W	X-gal staining	Newly bone synthesis in the defect in Pullulan + BMP-2 and Pullulan + FGF18 + BMP-2 groups Osterix 1 gene activated for the formation of new bone in Pullulan-Rh + FGF18 + BMP-2 group
Takahata et al. (2015)	Rabbit (female, New Zealand), n = 6	Ulnar (diaphysis) L: 10 mm	1: α-TCP (N=NS) 2: Pullulan + β-TCP (N=NS)	4W 8W	HE staining; Safranin O staining (qualitative analysis)	Mature bone formation for Pullulan + β-TCP group Fragmented bone ingrowth for α-TCP group
		Mouse (female, C57BL/6J), n = 13	Femoral (Intramedullary injection) Size: NA	1: Empty (N = 4) 2: Pullulan (N = 4) 3: Pullulan + β-TCP (N = 4) 1: Empty (N = 3) 2: Pullulan (N = 3) 3: Pullulan + β-TCP (N = 3)	4W 2 W 5 W 8 W	Micro-CT (BMD in mg/cm ³) HE staining (qualitative analysis)
	Pig (female, NS), n = 4	Vertebral body Size: 1 cm ²	1: Empty (N=NS) 2: α-TCP (N=NS)	8 W	Micro-CT (CT number in Hounsfield Unit)	Pullulan + β-TCP ** > Empty

TABLE 4 | (Continued) Preclinical studies using Pullulan scaffolds for bone regeneration in orthotopic sites.

Author (Year)	Animal model (sex; species); n, number of animals used	Type of defect (defect size)	Conditions (N, number of defects created in total per condition)	Observation time [in day (D), week (W) or month (M)]	Experimental analysis	Results
			3: Pullulan + β -TCP (N=NS) 1: α -TCP (N=NS)	4 W	HE staining (qualitative analysis)	At 4W: bone defect recovered by bone healing for Pullulan + β -TCP group whereas α -TCP group demonstrated fragmented bone ingrowth
			2: Pullulan + β -TCP (N=NS)	8 W		
Charoenlarp et al. (2018)	Mouse (male, C57BL/6N), n = 6–10 per condition	Calvaria \varnothing : 3 mm H: NS	1: Pullulan (air) + PBS (N=NS) 2: Pullulan (freeze-dried) + PBS (N=NS) 3: Pullulan (cross-linked RGD) + PBS (N=NS) 4: Pullulan (air) + BMP-2 + FGF18 (N=NS) 5: Pullulan (freeze-dried) + BMP-2 + FGF18 (N=NS) 6: Pullulan (cross-linked RGD) + BMP-2 + FGF18 (N=NS)	0 W 1 W 2 W 3 W 4 W 6 W 8 W	Micro-CT (% of healing) Modified Tetrachrome staining (qualitative analysis)	At 8W: Pullulan (cross-linked RGD) + BMP-2 + FGF18 * > Pullulan (freeze-dried) + BMP-2 + FGF18 Whether Pullulan was cross-linked with RGD peptides or freeze-dried and combined with BMP-2 and FGF18, it showed trabecular bone formation with calcified bone fragmented Presence of osteoblasts in Pullulan (cross-linked RGD) + BMP-2 + FGF18 and bone regeneration begun under the nanogel
	Mouse (male, ICR), n = 3–4 per condition	Calvaria \varnothing : 3 mm H: NS	1: Pullulan (cross-linked RGD) + PBS (N=NS) 2: Pullulan (cross-linked RGD) + BMP-2 + FGF18 (N=NS)	1 W	Modified Tetrachrome staining (qualitative analysis)	
Popescu et al. (2019)	Rat (male, Wistar), n = 30	Femoral (diaphysis, unicortical) W: 2 mm	1: Alginate/Pullulan (N=NS) 2: Alginate/Pullulan + β -TCP/HA (N=NS) 3: Alginate/Pullulan/0.5CuBG (N=NS) 4: Alginate/Pullulan/1.5CuBG (N=NS) 5: Alginate/Pullulan/BG (N=NS)	0 D 5 D 28 D 0 D 35 D	MRI (Bone defect width in μ m) HE staining (qualitative analysis)	All groups showed a decrease in bone defect size but it was faster for Alginate/Pullulan/1.5CuBG group (No statistical comparison done) Alginate/Pullulan/0.5 or 1.5CuBG showed osteoid tissue formation with parallel organized fibers

BG, bioglass; BMD, bone mineral density; BMP, bone morphogenetic protein; BV, bone volume; β -TCP, beta-tricalcium phosphate; H, height; HA, hydroxyapatite; HE, hematoxylin and eosin; L, length; Micro-CT, micro-computed tomography; NA, not applicable; NaCl sodium chloride; NS, not specified; PBS, phosphate buffer saline; Rh rhodamine; W, width; X-gal 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; \varnothing , diameter.

Another reported strategy to enhance bone formation was the incorporation of bioactive molecules to these biomaterials to create a delivery system. Growth factors were employed in 13 studies, namely, bone morphogenetic proteins (Chen et al., 2005; Maire et al., 2005a; Chen et al., 2007; Degat et al., 2009; Hayashi et al., 2009; Abbah et al., 2012; Fujioka-Kobayashi et al., 2012;

Charoenlarp et al., 2018; Chen et al., 2019; Yu et al., 2020) (e.g., BMP-2 and BMP-7), basic fibroblast growth factor (Shoji et al., 2020) (bFGF), fibroblast growth factor (Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Charoenlarp et al., 2018) (FGF18), insulin-like growth factor (Chen et al., 2006) (IGF-1) and stromal-derived growth factor (Ritz et al., 2018) (SDF-1). One study reported the

TABLE 5 | Preclinical studies using Dextran and Pullulan scaffolds for bone regeneration in orthotopic sites.

Author (Year)	Animal model (sex; species); n, number of animals used	Type of defect (defect size)	Conditions (N, number of defects created in total per condition)	Observation time [in day (D), week (W) or month (M)]	Experimental analysis	Results
Fricain et al. (2013)	Rat (NS, Wistar), n = NS	Femoral (condyle) Ø: 5 mm	1: Empty (N = 6) 2: Pullulan/Dextran (N = 18)	15 D 30 D	Micro-CT (MC in mg; MD in mg/cm ³)	Pullulan/Dextran + HA * > Pullulan/Dextran * > Empty
		H: 6 mm	3: Pullulan/Dextran + HA (N = 18)	90 D	Von Kossa staining; Masson's Trichrome staining (qualitative analysis)	Tissue mineralization was more important for Pullulan/Dextran + HA than Pullulan/Dextran
	Goat (NS), n = 7	Mandibular Ø: 10 mm H: 8 mm	1: Empty (N = 2) 2: Pullulan/Dextran + HA (N = 10)	1 M 6 M	Micro-CT (qualitative analysis) Von Kossa staining; Masson's Trichrome staining (qualitative analysis)	Osteoid tissue formation observed for Pullulan/Dextran + HA group New osteoid tissue formation for Pullulan/Dextran + HA group and mineralized tissue
		Tibial (epiphysis) L: 40 mm W: 12 mm	1: Empty (N = 2) 2: Pullulan/Dextran + HA (N = 10)	1 M 6 M	Micro-CT (qualitative analysis) Von Kossa staining; Masson's Trichrome staining (qualitative analysis)	Mineralized tissue within the defect for Pullulan/Dextran + HA group Induction of mineralized tissue with organized lamellar bone by Pullulan/Dextran + HA group
Schlaubitz et al. (2014)	Rat (female, Wistar Rj-Han), n = 18	Femoral (condyle) Size: 38 mm ³	1: Empty (N = 18) 2: Pullulan/Dextran + HA (N = 18)	15 D 30 D 70 D	Micro-CT (BMC in mg; BMD in mg/cc) Von Kossa staining (osteoid within the region of interest in %)	Pullulan/Dextran + HA ** > Empty Pullulan/Dextran + HA ** > Empty
Frasca et al. (2017)	Rat (male, Lewis), n = 90	Femoral metaphysis Ø: 3 mm H: 5 mm	1: Empty (N = 30) 2: MSCs (N = 30) 3: Pullulan/Dextran (N = 30) 4: Pullulan/Dextran + MSCs (N = 30) 5: HA/β-TCP (N = 30) 6: HA/β-TCP + MSCs (N = 30)	7 D 30 D 90 D	Micro-CT (BV/TV in %) Von Kossa staining; Masson's Trichrome staining (qualitative analysis)	At 30D: Pullulan/Dextran + MSCs* > MSCs For Pullulan/Dextran with or without MSCs groups, formation of trabecular and cortical bones
Ribot et al. (2017)	Rat (female, Wistar Rj-Han), n = 33	Femoral condyle	1: Pullulan/Dextran + Fucoïdan (N = 15) 2: Pullulan/Dextran + HA (N = 12) 3: Pullulan/Dextran + Fucoïdan + HA (N = 18)	1 W	MRI (Volume of hyper intense signal in mm ³)	At 3W: Pullulan/Dextran + Fucoïdan > Pullulan/Dextran + Fucoïdan + HA * > Pullulan/Dextran + HA *
		Ø: 3,5 mm	1: Pullulan/Dextran + Fucoïdan (N = 24) 2: Pullulan/Dextran + HA (N = 24)	3 W 5 W	Micro-CT (BV/TV in %)	At 5W: Pullulan/Dextran + HA** > Pullulan/Dextran + Fucoïdan + HA** > Pullulan/Dextran + Fucoïdan
		H: 4 mm	3: Pullulan/Dextran + Fucoïdan + HA (N = 30)		Masson's Trichrome staining (% of mature bone per defect)	At 3W: Pullulan/Dextran + HA * > Pullulan/Dextran + Fucoïdan + HA * > Pullulan/Dextran + Fucoïdan
Fricain et al. (2018)	Sheep (NS), n = 12	Maxillary sinus (i.e. sinus lift procedure)	1: Bio-Oss® (N = 12) 2: Pullulan/Dextran + HA (N = 12)	0 M 3 M	Micro-CT (MV/TV ratio)	Pullulan/Dextran + HA ≈ Bio-Oss® (n/s)
				6 M	Masson's Trichrome staining (Bone tissue in mm ²)	Pullulan/Dextran + HA ≈ Bio-Oss® *

(Continued on following page)

TABLE 5 | (Continued) Preclinical studies using Dextran and Pullulan scaffolds for bone regeneration in orthotopic sites.

Author (Year)	Animal model (sex; species); n, number of animals used	Type of defect (defect size)	Conditions (N, number of defects created in total per condition)	Observation time [in day (D), week (W) or month (M)]	Experimental analysis	Results
Maurel et al. (2021)	Rat (female, NS), n = 6	Femoral condyle	1: Pullulan/Dextran + HA resuspended in NaCl 0.9% (N = 6)	30 D	Micro-CT (BV/TV ratio)	No significant difference between the two groups
		Ø: 4 mm H: 6 mm	2: Pullulan/Dextran + HA resuspended in autologous blood (N = 6)	60 D	Masson's Trichrome staining (new bone surface in %)	Osteoid tissue formation with trabecular-like structures for both conditions
	Sheep (NS), n = 3	Maxillary sinus (i.e. sinus lift procedure)	1: Pullulan/Dextran + HA resuspended in NaCl 0.9% (N = 3) 2: Pullulan/Dextran + HA resuspended in autologous blood (N = 3)	3 M	Cone Beam Computer Tomography (MV/TV ratio) Masson's Trichrome staining (new bone surface in %)	No significant difference between the two groups Osteoid tissue formation for both conditions

BMC, bone mineral content; BMD, bone mineral density; BV/TV, bone volume over total volume; β-TCP, beta-tricalcium phosphate; H, height; HA, hydroxyapatite; L, length; MC, mineral content; MD, mineral density; Micro-CT, micro-computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; MSCs, mesenchymal stromal cells; MV/TV, mineral volume over total volume; NS, not specified; NaCl, sodium chloride; * p < 0.05; ** p < 0.01; ø, diameter.

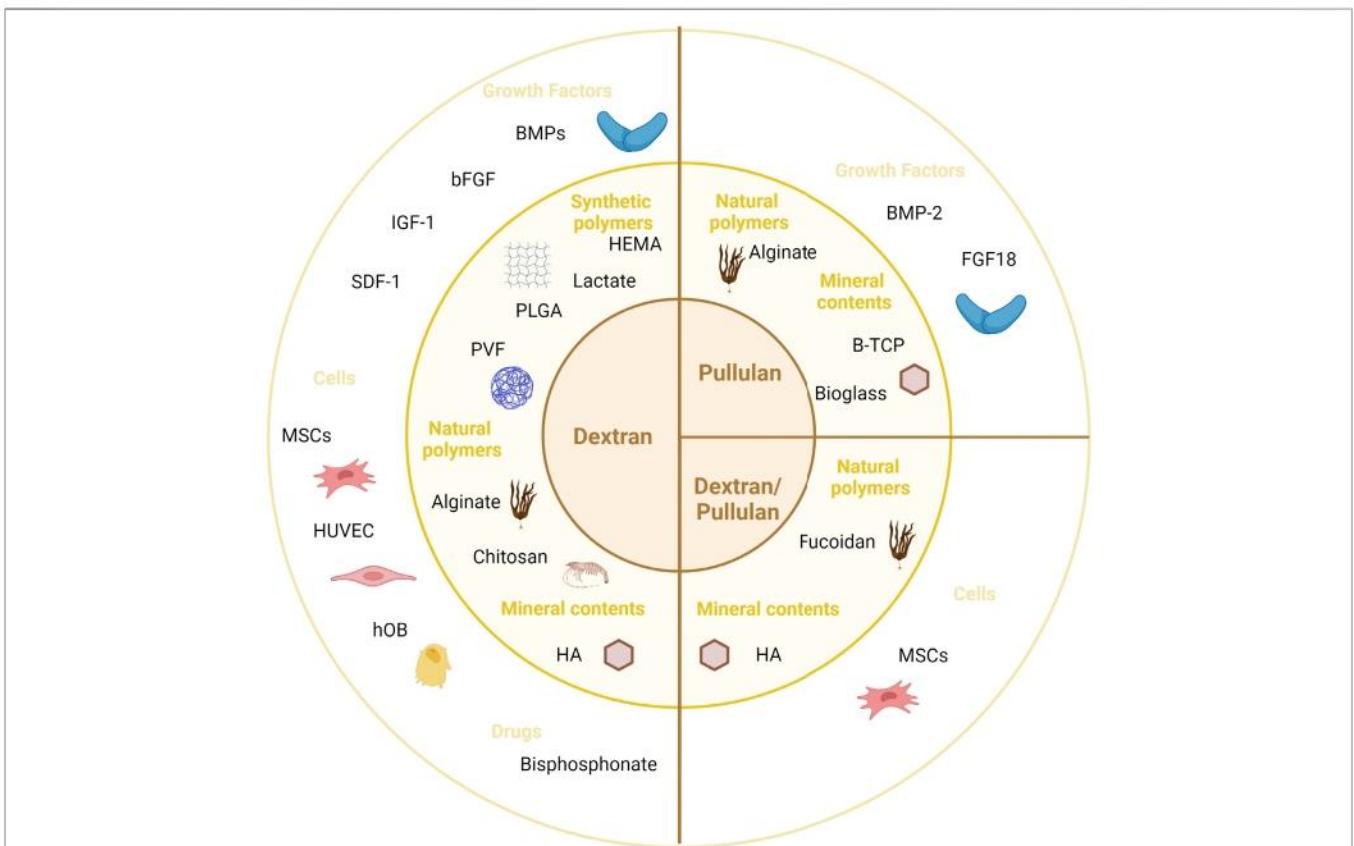


FIGURE 5 | Dextran and/or pullulan-based scaffolds for bone tissue engineering applications. Created with BioRender.com. bFGF, basic fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; B-TCP, beta-tricalcium phosphate; FGF, fibroblast growth factor; HA, hydroxyapatite; HEMA, hydroxyethyl methacrylate; hOB, human osteoblast; HRP, horseradish peroxidase; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IGF, insulin-like growth factor; MSCs, mesenchymal stromal cells; PLGA, poly-(L-glutamic acid); PVF, polyvinyl formal; SDF, stromal-derived growth factor.

incorporation into the scaffold of bisphosphonate, which exhibits strong affinity with hydroxyapatite (Wang et al., 2021).

Incorporation of cells into the polysaccharide scaffolds was the last identified procedure to promote bone regeneration (three studies). Three types of cells have been incorporated to scaffolds to promote bone regeneration: rat mesenchymal stromal cells (Bölgen et al., 2014; Frasca et al., 2017) (MSCs), human umbilical vein endothelial cells (Ritz et al., 2018) (HUVEC), or human osteoblasts (Ritz et al., 2018).

For all these different strategies, the performance for regenerating bone tissue is examined in the following sections.

3.4 Evaluation of Performance of Polysaccharide-Based Materials for Bone Formation

3.4.1 Dextran-Based Materials for Bone Regeneration

Twelve studies investigated orthotopic bone formation by using dextran-based biomaterials and four studies investigated ectopic bone formation in rodents (Tables 2, 3).

3.4.1.1 Dextran-Based Materials as a Bone Graft Substitute

To determine bone regeneration ability of dextran-derived biomaterials, several studies combined this polysaccharide with natural or synthetic polymers. For example, polyvinyl formal (PVF) sponges have been coated with dextran to enhance the poor osteogenic ability of this synthetic polymer due to its fibrous construction (Togami et al., 2015). Investigation of the water holding capability of the scaffold revealed that dextran-coated PVF sponge with high water capability significantly improved bone formation in a rat femoral defect.

Three studies assessed the osteogenic capability improvement of dextran-based hydrogels loaded with mineral particles. Dextran-based hydrogel combined with a synthetic polymer (polyacrylamide) loaded or not with hydroxyapatite (HA) particles was implanted into a rabbit femoral defect (Fang et al., 2019). Bone regeneration was significantly improved in the presence of HA. In another case, dextran was mixed to chitosan with strontium-doped mineral particles to further improve bone regeneration (Ding et al., 2019). Nanohydroxyapatite particles doped with increasing molar ratios of strontium (0%, 50%, and 100%) were incorporated into the polymeric mixture and implanted in a rat calvarial defect model. The adjunction of nanohydroxyapatite doped with 100% strontium significantly enhanced bone regeneration, whereas the dextran-based hydrogel without strontium-nanohydroxyapatite showed the lowest regeneration rate.

Finally, an injectable hydrogel composed of dextran and poly (L-glutamic acid) inspired from mussel adhesion to design an adhesive, self-healing biomaterial with osteogenic properties through HA and bisphosphonate incorporation inside the scaffold was designed by Wang et al. (2021). Scaffolds were implanted in a rat calvarial defect and showed a significant enhancement of bone regeneration compared with control.

3.4.1.2 Dextran-Based Material to Create Heparan Sulfate Mimetic Molecules (i.e., Regenerating Agent, RGTA[®])

Regenerating Agents (RGTA[®]) are polysaccharides designed to replace altered heparan sulfate in injured tissues (Barritault et al., 2017). They are derived from dextran that is chemically modified by sulfate and carboxyl groups. One of these RGTA[®], derived from dextran, was investigated for bone regeneration in a rat calvarial defect model (Lafont et al., 2004). Where dextran backbone was functionalized with methylcarboxyl, benzylamide, and sulfate groups. Two conditions were applied on a collagen sponge either with a solution of dextran derivatives like RGTA[®] or with PBS. Bone healing occurred earlier with the dextran derivative at 7 days after implantation.

3.4.1.3 Dextran-Based Material as a Potential Cell Carrier System

Scaffold designed for BTE loaded with cells can act as a carrier system if cells loaded on the scaffold stay inside to recruit endogenous cells, or can act as a cell delivery system if cells migrate to the surrounding tissue (Lalande et al., 2011). Two studies reported the use of dextran-derived biomaterials as a carrier for cell delivery (Bölgen et al., 2014; Ritz et al., 2018). A dextran-based cryogel was implanted in a rat calvarial defect loaded with or without stem cells (rat MSCs) (Bölgen et al., 2014). Bone regeneration significantly increased over time in both conditions. However, no significant difference was evidenced between the “scaffold-stem cells” group and the cell-free scaffold group whatever the time point (30 and 90 days). These results were consistent with another study focusing on a dextran-based material loaded with HUVECs and osteoblasts. (Ritz et al., 2018). Dextran-based hydrogels were either loaded with a monoculture of HUVECs or a co-culture of human osteoblasts with HUVECs. Results at 8 weeks showed that hydrogels loaded with HUVECs significantly enhanced bone formation compared with the defect left empty. However, this study showed no significant difference between the “scaffold-cells” group and the cell-free scaffold group, thereby demonstrating that a use of dextran-based hydrogels as a cell carrier system to deliver rat MSCs or HUVECs fail to enhance dextran osteogenic properties.

3.4.1.4 Dextran-Based Material as a Growth Factor Carrier

Dextran-derived biomaterials were also reported as growth factor carriers to promote bone regeneration. As previously mentioned, dextran polysaccharide chains have been chemically modified by amine, amide, carboxyl or acrylic groups to promote growth factor delivery system. Those modifications were performed either to 1) cross-link the polymeric scaffold to enable the encapsulation of growth factors or 2) to directly interact with them.

Four studies investigated the osteoinductive potential of dextran-based materials as a delivery growth factor system in ectopic bone formation models (Maire et al., 2005a; Degat et al., 2009; Chen et al., 2019; Yu et al., 2020) (Table 2).

Maire et al. (2005a) used modified dextran with different degrees of substitution of hydroxyl groups (i.e., number of modified groups adding per 100 glucose units) and combined extracted bovine BMP-2 (0.5 and 5 µg) to analyze ectopic bone

formation and calcification. Modification of the dextran backbone enabled cross-linking of the scaffold. It appeared that depending on the functionalization rate of dextran (e.g., degree of substitution of 0%, 2% or 18% w/w), BMP-2 was gradually delivered to the surrounding environment to promote bone formation and calcification. The highest growth factor retention was observed using the highest functionalized dextran content (D.S. = 18%). Small concentration of BMP (0.5 µg) failed to induce bone formation regardless of the functionalization rate.

In another study, the number of carboxymethyl and benzylamide groups (i.e., for cross-linking purpose) on dextran backbone was modified to investigate subcutaneously BMP-2 delivery (Degat et al., 2009). A dose-dependent trend was observed: 1 or 10 µg of modified dextran were sufficient to induce ectopic bone formation whereas a higher concentration of this dextran derivative (100 µg) inhibited such formation.

The impact of sulfated groups on different polymers (e.g., chitosan, dextran) and its ability to release rhBMP-2 (10 µg) was determined in a mouse muscle implantation model (Chen et al., 2019). Dextran substitutes improved binding with cytokine (e.g., rhBMP-2) through electrostatic interactions but generated few bones ectopically compared with chitosan. It was hypothesized that the modified dextran having less sulfated groups than the modified sulfated chitosan, it failed to properly deliver rhBMP-2 and induce bone formation.

The last study in ectopic model by Yu et al. (2020). confirmed these findings by loading unmodified dextran with rhBMP-2. It appeared that dextran scaffold generated few trabecular structures after 8 weeks.

Five studies reported the use of dextran-based materials as a delivery growth factor in orthotopic bone models. Dextran-based microbeads modified with an amino group, diethylaminoethyl (DEAE) was investigated in a rat arthrodesis model (Abbah et al., 2012). Dextran-based scaffold failed to successfully deliver BMP-2 (5 µg) and to induce bone formation as shown by micro-CT analysis. In comparison, another amino group (i.e., tyramine) was used to modify dextran backbone in a mice fracture model (Shoji et al., 2020). This association has improved the delivery of b-FGF and accelerate bone formation. Large calluses and new bone areas were observed at the fracture site.

Another team assessed the potential of dextran/gelatin scaffolds to act as a delivery growth factors system [e.g., BMP-2 (Chen et al., 2005; Chen et al., 2007) or IGF-1 (Chen et al., 2006)] in a periodontal defect model on dogs. Chemical properties of dextran/gelatin scaffold were investigated by functionalized dextran (Chen et al., 2006), and growth factors entrapment inside the scaffold (Chen et al., 2005; Chen et al., 2007). Here, the functionalization of dextran backbone only played a role on the reticulation process of the biomaterial. In their first study (Chen et al., 2005), dextran/gelatin microspheres were combined with BMP-2 and mixed in CPC to fill periodontal defect. In addition, a chitosan membrane loaded with these microspheres was added to cover the defect. Compared with the control group (i.e., CPC covered by chitosan membrane), dextran/gelatin microspheres covered with the chitosan membrane presented new bone formation 8 weeks after surgery.

Another approach concerns the dextran functionalization with glycidyl methacrylate at different degrees of substitution (e.g., 4.7, 6.3, and 7.8) combined with IGF-1 (Chen et al., 2006). Dextran with the smallest rate of substitution (D.S. = 4.7) showed positive results to properly deliver IGF-1 and then regenerate bone.

Chen et al. (2007) investigated whether BMP-2 had to be adsorbed or loaded through microsphere encapsulation in the dextran/gelatin scaffold. BMP-2 activity seemed to be better preserved when loaded in dextran/gelatin microspheres in the scaffold compared when it was adsorbed at the surface of the material.

Finally, dextran scaffold was successfully loaded with stromal-derived growth factor (SDF-1) in a mice calvarial defect. Bone regeneration was significantly improved compared with the empty defect (Ritz et al., 2018), but without significant difference with the growth factor-free scaffold.

3.4.2 Bone Formation With Pullulan Substitutes

Six studies investigated orthotopic bone formation by using pullulan-based biomaterials and one study assessed ectopic bone formation in rodents (Tables 2, 4).

3.4.2.1 Pullulan-Based Materials as a Bone Graft Substitute

Numerous studies described the performance of composite materials with pullulan. Combination of pullulan to alginate and bioactive glasses with various percentage of copper oxide to regenerate bone was investigated in a rat femoral defect and was compared with a commercial β -TCP/HA substitute embedded in an alginate-pullulan composite scaffold (Popescu et al., 2020). A progressive healing of bone was observed whatever the tested scaffold composition. Interestingly, a regeneration process was also observed when the alginate-pullulan composite materials were implanted in such orthotopic site without an osteoconductive component (i.e., β -TCP/HA and bioglass), thereby suggesting the potential of these materials for BTE applications. However, there was no empty group as a control in this study.

Phosphorylated-pullulan mixed with β -TCP had been tested in three different models, a rabbit ulnar defect, a pig vertebral defect, and a mouse femoral injection (Takahata et al., 2015). It showed similar bone regeneration compared to a clinical bone substitute made of α -TCP (Biopex-R[®]) in a rabbit ulnar bone defect model. Additionally, implantation of the composite scaffold induced new bone formation at 4 and 8 weeks, whereas Biopex-R[®] remained isolated from the surrounding bone at 8 weeks.

3.4.2.2 Pullulan-Based Material as a Potential Growth Factor Carrier

Three studies mentioned the substitution of pullulan main chains by cholesteryl and acryloyl groups to proceed cross-linking between pullulan macromolecules and then to establish a growth factor delivery system (Hayashi et al., 2009; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Charoenlarp et al., 2018). Modified pullulan successfully delivered BMP-2 (2 µg) and induced bone formation ectopically in a mice model (Hayashi et al., 2009). The

potential of this scaffold to deliver BMP-2 and promote bone regeneration by varying BMP-2 concentration was then determined in an orthotopic mouse calvarial model. Implantation of pullulan-based hydrogel containing 2 µg of BMP-2 showed the best results which was evidenced by the complete healing of the critical defect. One study described the effect of a co-administration of FGF18 and BMP-2 implanted in a bone defect using a pullulan-based hydrogel (Fujioka-Kobayashi et al., 2012). The amount of newly formed bone was higher when both growth factors were delivered, suggesting that this system improved the efficiency of BMP2-dependent bone healing in a mouse calvarial defect model.

Charoenlarp et al. (2018) also used pullulan-based materials to act as a delivery system for multiple growth factors (i.e., BMP-2 and FGF18). They assessed their growth factor release pattern and observed an initial burst followed by a gradual sustained release more than 1 week. They also observed that functionalization with RGD peptides during synthesis of gels enhanced bone healing as growth factors interact with the repeated units.

3.4.2.3 Pullulan-Based Membrane for Guided Bone Regeneration

A nanogel membrane made with cholesteryl and acryloyl-binding pullulan was evaluated for guiding bone regeneration (Miyahara et al., 2012). This nanogel membrane was compared with a commercially available collagen membrane (Koken Tissue Guide®) in a rat calvarial defect and they both stimulated bone regeneration compared with the control, in which no membrane was applied. Earlier bone regeneration was significantly enhanced with the pullulan-based nanogel membrane and newly formed bone was more mature 2 weeks after surgery.

3.4.3 Pullulan/Dextran-Based Materials for Bone Regeneration

Six studies investigated orthotopic bone formation by using pullulan/dextran-based biomaterials in which one study also assessed ectopic bone formation in rodents and goats (Tables 2, 5).

3.4.3.1 Pullulan/Dextran-Based Substitute Used as a Bone Graft Substitute

One team focused on a composite scaffold combining a pullulan/dextran-based material with HA particles to promote osteogenesis (Fricain et al., 2013; Schlaubitz et al., 2014; Ribot et al., 2017; Fricain et al., 2018; Maurel et al., 2021). Firstly, this biomaterial was supplemented or not with hydroxyapatite in heterotopic and orthotopic sites on mice and goat to investigate the osteoinductive and osteoconductive properties (Fricain et al., 2013). Subcutaneous and intra-muscular implantations on small and large mammals revealed that this pullulan/dextran scaffold combined with HA enabled osteoid tissue formation. Besides, the composite scaffold induced a highly mineralized tissue in three different bony sites (e.g., femur, mandible, and tibia), as well as osteoid tissue and bone tissue regeneration in direct contact to the matrix. The same composite scaffold was then designed as cross-linked microbeads to be

implanted in a rat femoral defect (Schlaubitz et al., 2014). Bone regeneration was significantly enhanced compared with the empty group. Interestingly, one study compared in a maxillary bone defect in sheep this pullulan/dextran-based scaffold with HA to a widely used clinical xenograft (BioOss®) (Fricain et al., 2018). Similar results were obtained for both materials. These composite microbeads were also either reconstituted in saline buffer or autologous blood to investigate the role of this vehicle for bone regeneration (Maurel et al., 2021). They displayed important mineralization process without significant difference, thereby suggesting that reconstitution of microbeads with autologous blood is not required. A study focused on the interest of Magnetic Resonance Imaging (MRI) for longitudinal evaluation of three different biomaterials based on pullulan/dextran and containing either fucoidan and/or HA for bone regeneration in a rat femoral bone defect (Ribot et al., 2017). The high sensitivity of MRI showed that the material without HA was the least efficient for bone regeneration, which was confirmed by micro-CT images and histology. After 5 weeks, pullulan/dextran-based scaffold containing either HA alone or Fucoidan plus HA showed similar results.

3.4.3.2 Pullulan/Dextran-Based Material as a Potential Stem Cell Vehicle

Pullulan/dextran polysaccharide-based scaffold supplemented with MSCs was compared with a commercially available CPC bone substitute (Calcioreorb C35®) (Frasca et al., 2017) for their ability to promote bone regeneration once loaded with cells. They were implanted alone or combined with syngenic MSCs from rat bone marrow. After 1 month, MSCs combined with these biomaterials significantly enhanced bone healing compared with their respective group without MSCs. After 3 months, bone regeneration was significantly enhanced for each condition without difference between cellularized and non-cellularized biomaterials. Results also showed that pullulan/dextran substitutes had a better resorption rate than CPC particles.

4 DISCUSSION

The purpose of this work was to review the design of pullulan and/or dextran-derived biomaterials used for bone regeneration. Polysaccharide scaffolds were systematically analyzed. These scaffolds were mostly used as a bone substitute (13 studies) or as a growth factor delivery system (13 studies). Three studies investigated the ability of these polysaccharide-based scaffolds to act as cell carriers for BTE applications and only one study suggested the use of a pullulan-based nanogel as a membrane for guided bone regeneration (Miyahara et al., 2012). The present systematic review showed that most of the pullulan-based and dextran-based materials underwent functionalization methods for BTE applications. Chemical functionalization is the most widely used approach to improve reticulation process and/or to promote their binding capacity to growth factors, thus enhancing their potential to act as growth factors carrier. The

introduction of charged groups also seemed to provide binding sites for host cells to adhere to the material (Filippi et al., 2020). Addition of acrylate groups (e.g., acryloyl, cholesteryl) was the most reported process to functionalize pullulan-based hydrogel (Hayashi et al., 2009; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Miyahara et al., 2012; Charoenlarp et al., 2018). Hydrogels of cholesterol-bearing pullulan are already considered as unique materials for various drug delivery applications (Morimoto et al., 2005a; Kato et al., 2007). Combination of cholesteryl group-associated hydrophobic domains and hydrophilic polysaccharide chains provides an amphiphilic hydrogel that shows effective drug-trapping sites in itself (Akiyoshi et al., 1998).

A wide range of functionalization methods were used for dextran-based materials, making it impossible to select a specific one for these polysaccharide-based materials. Interestingly, no chemical modification of pullulan/dextran-based matrix was also reported (Fricain et al., 2013; Schlaubitz et al., 2014; Frasca et al., 2017; Ribot et al., 2017; Fricain et al., 2018; Maurel et al., 2021).

This review also highlights the significant use of cross-linking reagents for these polysaccharide-based biomaterials synthesis. Cross-linkers have attracted much attention to enhance the biological functionality and mechanical properties of biopolymers (Oryan et al., 2018; Krishnakumar et al., 2019). Cross-linking strategies vary depending on the chemical nature of the biomaterials. This review emphasized that chemical cross-linkers were extensively used in the included studies. This is consistent with previous studies that establish that chemical cross-linking is the most commonly employed strategy to develop bone substitutes (Krishnakumar et al., 2019). For instance, successful chemical cross-linking of pullulan/dextran-based materials was carried out using the cross-linking agent STMP (Fricain et al., 2013; Schlaubitz et al., 2014; Frasca et al., 2017; Ribot et al., 2017; Fricain et al., 2018; Maurel et al., 2021). STMP is a nontoxic cross-linker, already used in the food industry (to cross-link starch) or for pharmaceutical applications (for hydrogels synthesis) (Gliko-Kabir et al., 2000; Lack et al., 2007). The present review outlined that pullulan/dextran-based materials were cross-linked with STMP. However, it should be mentioned that all the works carried out on pullulan/dextran-based materials comes from the same group. Pullulan-based materials were successfully cross-linked with thiol-bearing in four studies (Hayashi et al., 2009; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Miyahara et al., 2012; Charoenlarp et al., 2018), whereas no cross-linking reagents were used in two studies. Finally, cross-linking strategies were less employed to functionally modify dextran-based materials (only half of the included studies). Furthermore, each study focused on a different cross-linking process, making it difficult to draw conclusions.

Biomaterial design also plays a key role in promoting bone healing. In the present review, we outlined that these polysaccharide-derived biomaterials are mainly used as hydrogels or microbeads. A growing interest for polymer hydrogels in BTE is arising (Tang et al., 2021) as they exhibit several promising properties in a context of bone repair: they are ready-to-use material that can be molded to any shape, size, or form, thereby fitting easily in the bone defect (Li et al., 2021). Six

studies designed disc-shaped hydrogels to adjust calvarial bone defects (Hayashi et al., 2009; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Bölgen et al., 2014; Charoenlarp et al., 2018; Ritz et al., 2018; Fang et al., 2019). Otherwise, *in situ* forming hydrogels were directly injected into the defect area, molding the defect site (Ding et al., 2019; Shoji et al., 2020), thereby ensuring a tight interface with the surrounding bone (El-Sherbiny and Yacoub, 2013; Maisani et al., 2018). Microbeads can be also easily adapted to a complex bone defect. Injectable hydrogels or microbeads allow minimal invasion of surrounding tissues during delivery (Ding et al., 2019).

Hydrogels also are good candidates to incorporate cells or growth factors and act as a delivery system. Pullulan and/or dextran-based materials display unique properties in the field of bone regeneration compared with commonly used bone substitutes. They exhibit resorption ability (Miyahara et al., 2012; Bölgen et al., 2014; Frasca et al., 2017), thereby ensuring the gradual replacement with newly formed bone compared with HA/TCP ceramics that exhibit extensive *in situ* resorption latencies (Keller et al., 2012). Another interesting property of these polymers is their radiotransparency (Hayashi et al., 2009; Frasca et al., 2017; Fricain et al., 2018) meaning that it allows to follow radiologically the new bone formation.

Several studies investigated the osteogenic properties of these polysaccharides-derived biomaterials through the adjunction of mineral contents. Most of these studies show a significant improvement of bone regeneration by incorporation of mineral contents. HA supplementation was used in eight of these 10 studies. This stimulates bone tissue formation and gives osteoconductive properties to the biomaterial. In addition, dextran and/or pullulan have been reinforced with mineral materials to overcome their weak physical properties (Fricain et al., 2013; Schlaubitz et al., 2014; Takahata et al., 2015; Ribot et al., 2017; Fricain et al., 2018; Ding et al., 2019; Fang et al., 2019; Popescu et al., 2020; Maurel et al., 2021; Wang et al., 2021) and then improve their mechanical strength.

Another reported strategy to enhance bone regeneration of dextran and/or pullulan-based materials was the encapsulation of growth factors. Growth factors are widely used in BTE to provide more regulating cues to target cell proliferation and differentiation and effective bone repair (Tang et al., 2021). A total of 13 studies reported the ability of pullulan-based materials and dextran-based materials to deliver growth factors. Most of them (i.e., 11 studies) focused on BMP-2 which play critical roles in bone regeneration process (Rao et al., 2018; Tang et al., 2021). A sustained release of this growth factor appeared to be difficult as heterotopic bone formation is usually observed due to its overexpression. Customization of biomaterials could be an alternative to regulate BMP-2 delivery. For example, chemical modification of polysaccharides was performed to enhance growth factors bearing within the scaffold to act as a drug delivery system. The addition of carboxylate, benzylamide, and sulfated groups to dextran-based scaffold enabled to mimic heparin-like compounds (Lafont et al., 2004; Maire et al., 2005a; Degat et al., 2009), which is one of the ECM

components that has high affinity with growth factors. Functionalized dextran thus exhibits binding capacity to heparin-binding growth factors, such as transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) (Maire et al., 2005b). As TGF- β 1 and BMP-2 belong to the same superfamily and share one third of structural homology, functionalized dextran has the ability to bind to BMP-2 through its heparin-binding site (Maire et al., 2005a). This could be an alternative to the currently used collagen sponges that are approved by FDA to deliver BMP-2 (Maire et al., 2005a). Interestingly, heterotopic bone formation of BMP-2 loaded with heparin microparticles was investigated at high and low concentrations (0.12 and 0.01 mg/kg body weight) in a rat femoral defect (Hettiaratchi et al., 2020; Vantucci et al., 2021). BMP-2 delivery alone led to heterotopic bone formation whatever the concentration used. But when it was combined to heparin microparticles at a high dosage (30 μ g per graft), a sustained release was observed and seemed to regulate bone formation.

Interestingly, no study reported the use of a pullulan/dextran-based material to deliver growth factor. This could be explained by the ability of these matrices to retain local growth factors (Fricain et al., 2013). The combination of these two polysaccharides might be an ideal candidate to provide a growth factor-free biomaterial for BTE applications.

Finally, three studies investigated dextran or pullulan/dextran-based hydrogels capability to incorporate progenitor cells to promote bone healing (Bölgen et al., 2014; Frasca et al., 2017; Ritz et al., 2018). Two approaches can be evidenced in such scaffolds. In one hand, cells entrapped into the scaffold can migrate at the defect site to initiate the ossification process. On the other hand, they can stay inside the scaffold to recruit local factors. In these three studies, only one mentioned the use of pullulan/dextran biomaterial as a cell delivery system (Frasca et al., 2017). The two others did not specify the role of their biomaterial on the delivery of cells. Concerning the angiogenesis process of these biomaterials in bone defects, it was observed in all studies. However, no significant difference in bone regeneration amount was observed between the seeded scaffold and the cell-free scaffold in two studies, thereby suggesting that using dextran-based material as a potential cell carrier system does not increase its osteogenic potential. This could be related to a low ability of these polysaccharide-based hydrogels to support cell adhesion and proliferation. To overcome this drawback, Frasca et al. (2017) proposed a sequential multiple MSC administration strategy to cover the entirety of the repair process kinetic.

Only three studies (Takahata et al., 2015; Frasca et al., 2017; Fricain et al., 2018) compared the pullulan and pullulan/dextran-based materials to commercialized and commonly used bone substitutes. These commercial devices were either xenograft (e.g., Bio-Oss[®], extract from the mineral part of bovine bone) or alloplastic bone substitutes (e.g., Calcioreorb C35[®], composed of HA and TCP and Biopex-R[®], composed of α -TCP). Pullulan and pullulan/dextran-based materials seemed to be at least as efficient as these conventional and commercially available bone substitutes. Besides, alloplastic bone substitutes showed poor host integration and failed to

completely resorb *in vivo*, thereby preventing their replacement by newly formed bone. However, further studies comparing these polysaccharides to commercially used bone substitutes should be conducted to draw formal conclusions.

Finally, there are limitations related to the present systematic review that must be mentioned. One limitation of this study is the heterogeneity in animal models and the wide types of bone defects performed in the included studies, thereby making it difficult to compare studies. Calvarial and femoral defects were the most commonly used model to assess bone regeneration in these studies. Femoral defect may be more appropriate to consider load-bearing capacity of polysaccharide scaffolds when necessary (Taguchi and Lopez, 2021). Another identified drawback of this systematic review is the low number of studies investigating the mechanical properties of the materials (Abbah et al., 2012; Takahata et al., 2015; Ding et al., 2019; Fang et al., 2019). Among four studies, only one study evaluated the compressive strength directly on the bone with the investigating constructs (Abbah et al., 2012). It would be interesting to further evaluate the mechanical properties of these constructs and their evolution in time that should match the natural bone properties (Yunus Basha et al., 2015) to favor host bone integration (Giannoudis et al., 2007). Another interesting parameter to consider when evaluating a biomaterial for bone regeneration is the defect size, as non-critical size defect may heal spontaneously. Originally, critical-sized defect can be defined as the smallest size tissue defect that will not completely heal over the natural lifetime of an animal (Schmitz and Hollinger, 1986; Spicer et al., 2012). In practice, a defect is considered as critical-sized defect if it does not fully heal during the experimental time observation (Gosain et al., 2000; McGovern et al., 2018). Among the 28 included studies, all experiments using calvarial defects could be considered as critical-sized defect [e.g., more than 2 mm in mouse; more than 5 mm in rats (Taguchi and Lopez, 2021)]. For other bone models (e.g., tibia, ulnar, vertebrae), knowledge on the size considered as critical defect in those models could not be found in the literature. It would thus be interesting to compare these polysaccharides using the same animal model. The lack of empty defect condition as control in 13 studies (Lafont et al., 2004; Chen et al., 2005; Chen et al., 2007; Fujioka-Kobayashi et al., 2012; Bölgen et al., 2014; Togami et al., 2015; Ribot et al., 2017; Charoenlarp et al., 2018; Fricain et al., 2018; Ding et al., 2019; Fang et al., 2019; Popescu et al., 2020; Maurel et al., 2021), prevented readers to conclude on the relevance of the model used and the tested scaffolds. Further studies including an empty defect condition in the animal experimental design would be necessary to increase the relevance of results. We also observed that none of the included studies performed the required sample size calculation for each condition before conducting the experiments. It would be useful to report these data in future studies to better understand the study design. In addition, only two studies conducted a blinded assessment of outcomes. Blind assessment of the collected data reduces the risk of bias when interpreting the data. If

possible, this methodological parameter should be implemented in future preclinical studies to strengthen the level of evidence.

5 CONCLUSION

The present study emphasized that pullulan and/or dextran-based materials display unique properties for BTE applications. Moreover, this review is expected to provide clear information on the chemical functionalization of the pullulan-based and dextran-based materials and the cross-linking strategies for BTE applications. Interestingly, these polysaccharides are used as injectable hydrogels or microbeads that easily fit the bone defect. Incorporation of mineral contents such as hydroxyapatite to the pullulan and/or dextran-based biomaterials significantly enhance bone regeneration. We also outlined that the association of pullulan and dextran is a solution to obtain a biomaterial, deprived of growth factors or living cells to promote bone formation. Studies comparing these biomaterials with commercialized and clinically used products are too limited and further studies are required to draw more conclusions.

REFERENCES

- Abbah, S.-A., Liu, J., Lam, R. W. M., Goh, J. C. H., and Wong, H.-K. (2012). *In Vivo* bioactivity of rhBMP-2 Delivered with Novel Polyelectrolyte Complexation Shells Assembled on an Alginate Microbead Core Template. *J. Control. Release* 162, 364–372. doi:10.1016/j.jconrel.2012.07.027
- Akiyoshi, K., Kobayashi, S., Shichibe, S., Mix, D., Baudys, M., Wan Kim, S., et al. (1998). Self-assembled Hydrogel Nanoparticle of Cholesterol-Bearing Pullulan as a Carrier of Protein Drugs: Complexation and Stabilization of Insulin. *J. Control. Release* 54, 313–320. doi:10.1016/s0168-3659(98)00017-0
- Ana, I. D., Satria, G. A. P., Dewi, A. H., and Ardhani, R. (2018). Bioceramics for Clinical Application in Regenerative Dentistry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1077, 309–316. doi:10.1007/978-981-13-0947-2_16
- Banerjee, A., and Bandopadhyay, R. (2016). Use of Dextran Nanoparticle: A Paradigm Shift in Bacterial Exopolysaccharide Based Biomedical Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 87, 295–301. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.059
- Barritault, D., Gilbert-Sirieix, M., Rice, K. L., Siñeriz, F., Papy-Garcia, D., Baudouin, C., et al. (2017). RGTA or ReGeneraTing Agents Mimic Heparan Sulfate in Regenerative Medicine: from Concept to Curing Patients. *Glycoconj. J.* 34, 325–338. doi:10.1007/s10719-016-9744-5
- Bölgen, N., Korkusuz, P., Vargel, İ., Kılıç, E., Güzel, E., Çavuşoğlu, T., et al. (2014). Stem Cell Suspension Injected HEMA-Lactate-Dextran Cryogels for Regeneration of Critical Sized Bone Defects. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 42, 70–77. doi:10.3109/21691401.2013.775578
- Charoenlarp, P., Rajendran, A. K., Fujihara, R., Kojima, T., Nakahama, K.-i., Sasaki, Y., et al. (2018). The Improvement of Calvarial Bone Healing by Durable Nanogel-Crosslinked Materials. *J. Biomaterials Sci. Polym. Ed.* 29, 1876–1894. doi:10.1080/09205063.2018.1517403
- Chen, F.-m., Zhao, Y.-m., Wu, H., Deng, Z.-h., Wang, Q.-t., Zhou, W., et al. (2006). Enhancement of Periodontal Tissue Regeneration by Locally Controlled Delivery of Insulin-like Growth Factor-I from Dextran-Co-Gelatin Microspheres. *J. Control. Release* 114, 209–222. doi:10.1016/j.jconrel.2006.05.014
- Chen, F.-M., Zhao, Y.-M., Zhang, R., Jin, T., Sun, H.-H., Wu, Z.-F., et al. (2007). Periodontal Regeneration Using Novel Glycidyl Methacrylated Dextran (Dex-GMA)/gelatin Scaffolds Containing Microspheres Loaded with Bone

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF and J-CF contributed to conception and design of the study. Online screening of the included studies and extraction of the data were performed by two independent reviewers (MF and NA). NA wrote the first draft of the manuscript helped by MF. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

FUNDING

The authors declare that this study received funding from SILTISS. The funder had the following involvement in the study: Partial funding of PhD of NAO, manuscript revision, reading, and approval of the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the ANR (Agence Nationale de la Recherche) for financial support. The authors also acknowledge Siltiss.

Morphogenetic Proteins. *J. Control. Release* 121, 81–90. doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.023

- Chen, F., Wu, Z., Wang, Q., Wu, H., Zhang, Y., Nie, X., et al. (2005). Preparation and Biological Characteristics of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2-Loaded Dextran-Co-Gelatin Hydrogel Microspheres. *In Vitro and In Vivo Studies. Pharmacology* 75, 133–144. doi:10.1159/000088212
- Chen, H., Yu, Y., Wang, C., Wang, J., and Liu, C. (2019). The Regulatory Role of Sulfated Polysaccharides in Facilitating rhBMP-2-Induced Osteogenesis. *Biomater. Sci.* 7, 4375–4387. doi:10.1039/c9bm00529c
- Degat, M.-C., Dubreucq, G., Meunier, A., Dahri-Correia, L., Sedel, L., Petite, H., et al. (2009). Enhancement of the Biological Activity of BMP-2 by Synthetic Dextran Derivatives. *J. Biomed. Mat. Res.* 88A, 174–183. doi:10.1002/jbma.31884
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., and Giannoudis, P. V. (2011). Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Med.* 9, 66. doi:10.1186/1741-7015-9-66
- Ding, X., Li, X., Li, C., Qi, M., Zhang, Z., Sun, X., et al. (2019). Chitosan/Dextran Hydrogel Constructs Containing Strontium-Doped Hydroxyapatite with Enhanced Osteogenic Potential in Rat Cranium. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5, 4574–4586. doi:10.1021/acsbomaterials.9b00584
- El-Sherbiny, I. M., and Yacoub, M. H. (2013). Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering: Progress and Challenges. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2013, 38–342. doi:10.5339/gcsp.2013.38
- Fang, J., Li, P., Lu, X., Fang, L., Lü, X., and Ren, F. (2019). A Strong, Tough, and Osteoconductive Hydroxyapatite Mineralized Polyacrylamide/dextran Hydrogel for Bone Tissue Regeneration. *Acta Biomater.* 88, 503–513. doi:10.1016/j.actbio.2019.02.019
- Filippi, M., Born, G., Chaaban, M., and Scherberich, A. (2020). Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 474. doi:10.3389/fbioe.2020.00474
- Frasca, S., Norol, F., Le Visage, C., Collombet, J.-M., Letourneur, D., Holy, X., et al. (2017). Calcium-phosphate Ceramics and Polysaccharide-Based Hydrogel Scaffolds Combined with Mesenchymal Stem Cell Differently Support Bone Repair in Rats. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 28, 35. doi:10.1007/s10856-016-5839-6
- Fricain, J. C., Aid, R., Lanouar, S., Maurel, D. B., Le Nihouannen, D., Delmond, S., et al. (2018). In-vitro and In-Vvivo Design and Validation of an Injectable Polysaccharide-Hydroxyapatite Composite Material for Sinus Floor Augmentation. *Dent. Mater.* 34, 1024–1035. doi:10.1016/j.dental.2018.03.021

- Fricain, J. C., Schlaubitz, S., Le Visage, C., Arnault, I., Derkaoui, S. M., Siadous, R., et al. (2013). A Nano-Hydroxyapatite - Pullulan/dextran Polysaccharide Composite Macroporous Material for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* 34, 2947–2959. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.049
- Fujioka-Kobayashi, M., Ota, M. S., Shimoda, A., Nakahama, K.-i., Akiyoshi, K., Miyamoto, Y., et al. (2012). Cholesteryl Group- and Acryloyl Group-Bearing Pullulan Nanogel to Deliver BMP2 and FGF18 for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* 33, 7613–7620. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.075
- Fundueanu, G., Constantin, M., Mihai, D., Bortolotti, F., Cortesi, R., Ascenzi, P., et al. (2003). Pullulan-cyclodextrin Microspheres. *J. Chromatogr. B* 791, 407–419. doi:10.1016/s1570-0232(03)00258-7
- Giannoudis, P. V., Einhorn, T. A., and Marsh, D. (2007). Fracture Healing: the Diamond Concept. *Injury* 38 (Suppl. 4), S3–S6. doi:10.1016/s0020-1383(08)70003-2
- Gliko-Kabir, I., Yagen, B., Penhasi, A., and Rubinstein, A. (2000). Phosphated Crosslinked Guar for Colon-specific Drug Delivery. *J. Control. Release* 63, 121–127. doi:10.1016/S0168-3659(99)00179-0
- Gosain, A. K., Song, L., Yu, P., Mehrara, B. J., Maeda, C. Y., Gold, L. L., et al. (2000). Osteogenesis in Cranial Defects: Reassessment of the Concept of Critical Size and the Expression of TGF- β Isoforms. *Plastic Reconstr. Surg.* 106, 360–371. doi:10.1097/00006534-200008000-00018
- Hayashi, C., Hasegawa, U., Saita, Y., Hemmi, H., Hayata, T., Nakashima, K., et al. (2009). Osteoblastic Bone Formation Is Induced by Using Nanogel-Crosslinking Hydrogel as Novel Scaffold for Bone Growth Factor. *J. Cell. Physiol.* 220, 1–7. doi:10.1002/jcp.21760
- Hettiaratchi, M. H., Krishnan, L., Rouse, T., Chou, C., McDevitt, T. C., and Guldberg, R. E. (2020). Heparin-mediated Delivery of Bone Morphogenetic Protein-2 Improves Spatial Localization of Bone Regeneration. *Sci. Adv.* 6, eaay1240. doi:10.1126/sciadv.aay1240
- Hooijmans, C. R., Rovers, M. M., de Vries, R. B., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., and Langendam, M. W. (2014). SYRCL's Risk of Bias Tool for Animal Studies. *BMC Med. Res. Methodol.* 14, 43. doi:10.1186/1471-2288-14-43
- Hovgaard, L., and Brøndsted, H. (1995). Dextran Hydrogels for Colon-specific Drug Delivery. *J. Control. Release* 36, 159–166. doi:10.1016/0168-3659(95)00049-E
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., et al. (2017). Blends and Composites of Exopolysaccharides: Properties and Applications: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* 94, 10–27. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104
- Kashirina, A., Yao, Y., Liu, Y., and Leng, J. (2019). Biopolymers as Bone Substitutes: a Review. *Biomater. Sci.* 7, 3961–3983. doi:10.1039/c9bm00664h
- Kato, N., Hasegawa, U., Morimoto, N., Saita, Y., Nakashima, K., Ezura, Y., et al. (2007). Nanogel-based Delivery System Enhances PGE2 Effects on Bone Formation. *J. Cell. Biochem.* 101, 1063–1070. doi:10.1002/jcb.21160
- Keller, J., Brink, S., Busse, B., Schilling, A. F., Schinke, T., Amling, M., et al. (2012). Divergent Resorbability and Effects on Osteoclast Formation of Commonly Used Bone Substitutes in a Human In Vitro-assay. *PLoS One* 7, e46757. doi:10.1371/journal.pone.0046757
- Krishnakumar, G. S., Sampath, S., Muthusamy, S., and John, M. A. (2019). Importance of Crosslinking Strategies in Designing Smart Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Systematic Review. *Mater. Sci. Eng. C* 96, 941–954. doi:10.1016/j.msec.2018.11.081
- Kumari, L., and Badwaik, H. R. (2019). "Polysaccharide-based Nanogels for Drug and Gene Delivery," in *Polysaccharide Carriers for Drug Delivery*. Editors S. Maiti and S. Jana (Sawston, United Kingdom: Woodhead Publishing), 497–557. doi:10.1016/B978-0-08-102553-6.00018-0
- Lack, S., Dulong, V., Picton, L., Cerf, D. L., and Condamine, E. (2007). High-resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of Polysaccharides Crosslinked by Sodium Trimetaphosphate: a Proposal for the Reaction Mechanism. *Carbohydr. Res.* 342, 943–953. doi:10.1016/j.carres.2007.01.011
- Lafont, J., Blanquaert, F., Colombier, M. L., Barritault, D., Carueelle, J.-P., and Saffar, J.-L. (2004). Kinetic Study of Early Regenerative Effects of RGTA11, a Heparan Sulfate Mimetic, in Rat Craniotomy Defects. *Calcif. Tissue Int.* 75, 517–525. doi:10.1007/s00223-004-0012-5
- Lalande, C., Miraux, S., Miraux, S., Derkaoui, S., Mornet, S., Bareille, R., et al. (2011). Magnetic Resonance Imaging Tracking of Human Adipose Derived Stromal Cells within Three-Dimensional Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *eCM* 21, 341–354. doi:10.22203/ecm.v021a25
- Li, X., Yang, Z., Fang, L., Ma, C., Zhao, Y., Liu, H., et al. (2021). Hydrogel Composites with Different Dimensional Nanoparticles for Bone Regeneration. *Macromol. Rapid Commun.* 42, 2100362. doi:10.1002/marc.202100362
- Liang, W., Wu, X., Dong, Y., Shao, R., Chen, X., Zhou, P., et al. (2021). In Vivo behavior of Bioactive Glass-Based Composites in Animal Models for Bone Regeneration. *Biomater. Sci.* 9, 1924–1944. doi:10.1039/d0bm01663b
- Macleod, M. R., O'Collins, T., Howells, D. W., and Donnan, G. A. (2004). Pooling of Animal Experimental Data Reveals Influence of Study Design and Publication Bias. *Stroke* 35, 1203–1208. doi:10.1161/01.STR.0000125719.25853.20
- Maire, M., Chaubet, F., Mary, P., Blanchat, C., Meunier, A., and Logeartavramoglou, D. (2005a). Bovine BMP Osteoinductive Potential Enhanced by Functionalized Dextran-Derived Hydrogels. *Biomaterials* 26, 5085–5092. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.020
- Maire, M., Logeart-Avramoglou, D., Degat, M.-C., and Chaubet, F. (2005b). Retention of Transforming Growth Factor β 1 Using Functionalized Dextran-Based Hydrogels. *Biomaterials* 26, 1771–1780. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.003
- Maisani, M., Sindhu, K. R., Felon, M., Siadous, R., Rey, S., Mantovani, D., et al. (2018). Prolonged Delivery of BMP-2 by a Non-polymer Hydrogel for Bone Defect Regeneration. *Drug Deliv. Transl. Res.* 8, 178–190. doi:10.1007/s13346-017-0451-y
- Mallik, K. K., and Cox, S. C. (2013). Biomaterial Scaffolds for Tissue Engineering. *Front. Biosci.* 5, 341–360. doi:10.2741/e620
- Maurel, D. B., Fénelon, M., Aid-Launais, R., Bidault, L., Le Nir, A., Renard, M., et al. (2021). Bone Regeneration in Both Small and Large Preclinical Bone Defect Models Using an Injectable Polymer-based Substitute Containing Hydroxyapatite and Reconstituted with Saline or Autologous Blood. *J. Biomed. Mater. Res.* 109, 1840–1848. doi:10.1002/jbma.a.37176
- McGovern, J. A., Griffin, M., and Huttmacher, D. W. (2018). Animal Models for Bone Tissue Engineering and Modelling Disease. *Dis. Model. Mech.* 11, dmm033084. doi:10.1242/dmm.033084
- Miyahara, T., Nyan, M., Shimoda, A., Yamamoto, Y., Kuroda, S., Shiota, M., et al. (2012). Exploitation of a Novel Polysaccharide Nanogel Cross-Linking Membrane for Guided Bone Regeneration (GBR). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6, 666–672. doi:10.1002/term.475
- Moher, D., Shamseer, L., Shamseer, L., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., et al. (2015). Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) 2015 Statement. *Syst. Rev.* 4, 1. doi:10.1186/2046-4053-4-1
- Morimoto, N., Endo, T., Iwasaki, Y., and Akiyoshi, K. (2005a). Design of Hybrid Hydrogels with Self-Assembled Nanogels as Cross-Linkers: Interaction with Proteins and Chaperone-like Activity. *Biomacromolecules* 6, 1829–1834. doi:10.1021/bm050156x
- Morimoto, N., Endo, T., Ohtomi, M., Iwasaki, Y., and Akiyoshi, K. (2005b). Hybrid Nanogels with Physical and Chemical Cross-Linking Structures as Nanocarriers. *Macromol. Biosci.* 5, 710–716. doi:10.1002/mabi.200500051
- Oryan, A., Kamali, A., Moshiri, A., Baharvand, H., and Daemi, H. (2018). Chemical Crosslinking of Biopolymeric Scaffolds: Current Knowledge and Future Directions of Crosslinked Engineered Bone Scaffolds. *Int. J. Biol. Macromol.* 107, 678–688. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184
- Popescu, R. A., Tăbăran, F. A., Bogdan, S., Fărcațeanu, A., Purdoi, R., Magyari, K., et al. (2020). Bone Regeneration Response in an Experimental Long Bone Defect Orthotopically Implanted with Alginate-pullulan-glass-ceramic Composite Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 108, 1129–1140. doi:10.1002/jbmb.34464
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., and Khanda, S. M. (2013). Pullulan: an Exopolysaccharide and its Various Applications. *Carbohydr. Polym.* 95, 540–549. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.082
- R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti (Editors) (2014). *Principles of Tissue Engineering*. 4th ed. (Elsevier). doi:10.1016/C2011-0-07193-4
- Rao, S. H., Harini, B., Shadamarshan, R. P. K., Balagangadharan, K., and Selvamurugan, N. (2018). Natural and Synthetic Polymers/bioceramics/bioactive Compounds-Mediated Cell Signalling in Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 88–96. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.029
- Ribot, E. J., Tournier, C., Aid-Launais, R., Koonjoo, N., Oliveira, H., Trotier, A. J., et al. (2017). 3D Anatomical and Perfusion MRI for Longitudinal Evaluation of Biomaterials for Bone Regeneration of Femoral Bone Defect in Rats. *Sci. Rep.* 7, 6100. doi:10.1038/s41598-017-06258-0

- Ritz, U., Eberhardt, M., Klein, A., Frank, P., Götz, H., Hofmann, A., et al. (2018). Photocrosslinked Dextran-Based Hydrogels as Carrier System for the Cells and Cytokines Induce Bone Regeneration in Critical Size Defects in Mice. *Gels* 4, 63. doi:10.3390/gels4030063
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., et al. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the Art and New Perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* 78, 1246–1262. doi:10.1016/j.msec.2017.05.017
- Schlaubitz, S., Derkaoui, S. M., Marosa, L., Miraux, S., Renard, M., Catros, S., et al. (2014). Pullulan/dextran/nHA Macroporous Composite Beads for Bone Repair in a Femoral Condyle Defect in Rats. *PLoS One* 9, e110251. doi:10.1371/journal.pone.0110251
- Schmitz, J. P., and Hollinger, J. O. (1986). The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 205, 299–308. doi:10.1097/00003086-198604000-00036
- Shoji, S., Uchida, K., Saito, W., Sekiguchi, H., Inoue, G., Miyagi, M., et al. (2020). Acceleration of Bone Healing by In Situ-Forming Dextran-Tyramine Conjugates Containing Basic Fibroblast Growth Factor in Mice. *Cureus* 12, e10085. doi:10.7759/cureus.10085
- Simonsen, L., Hovgaard, L., Mortensen, P. B., and Brøndsted, H. (1995). Dextran Hydrogels for Colon-specific Drug Delivery. V. Degradation in Human Intestinal Incubation Models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3, 329–337. doi:10.1016/0928-0987(95)00023-6
- Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. A., Kasper, F. K., and Mikos, A. G. (2012). Evaluation of Bone Regeneration Using the Rat Critical Size Calvarial Defect. *Nat. Protoc.* 7, 1918–1929. doi:10.1038/nprot.2012.113
- Sun, G., Zhang, X., Shen, Y.-L., Sebastian, R., Dickinson, L. E., Fox-Talbot, K., et al. (2011). Dextran Hydrogel Scaffolds Enhance Angiogenic Responses and Promote Complete Skin Regeneration during Burn Wound Healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20976–20981. doi:10.1073/pnas.1115973108
- Taguchi, T., and Lopez, M. J. (2021). An Overview of De Novo Bone Generation in Animal Models. *J. Orthop. Res.* 39, 7–21. doi:10.1002/jor.24852
- Takahata, T., Okihara, T., Yoshida, Y., Yoshihara, K., Shiozaki, Y., Yoshida, A., et al. (2015). Bone Engineering by Phosphorylated-Pullulan and β -TCP Composite. *Biomed. Mat.* 10, 065009. doi:10.1088/1748-6041/10/6/065009
- Tang, G., Liu, Z., Liu, Y., Yu, J., Wang, X., Tan, Z., et al. (2021). Recent Trends in the Development of Bone Regenerative Biomaterials. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 665813. doi:10.3389/fcell.2021.665813
- Tassa, C., Shaw, S. Y., and Weissleder, R. (2011). Dextran-coated Iron Oxide Nanoparticles: a Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics, and Therapy. *Acc. Chem. Res.* 44, 842–852. doi:10.1021/ar200084x
- Togami, W., Sei, A., Okada, T., Taniwaki, T., Fujimoto, T., Tahata, S., et al. (2015). Effects of the Water-Holding Capability of Polyvinyl Formal Sponges on Osteogenic Ability In Vivo Experiments. *J. Biomed. Mat. Res.* 103, 188–194. doi:10.1002/jbm.b.33200
- Vantucci, C. E., Krishan, L., Cheng, A., Prather, A., Roy, K., and Guldberg, R. E. (2021). BMP-2 Delivery Strategy Modulates Local Bone Regeneration and Systemic Immune Responses to Complex Extremity Trauma. *Biomater. Sci.* 9, 1668–1682. doi:10.1039/d0bm01728k
- Wang, B., Liu, J., Niu, D., Wu, N., Yun, W., Wang, W., et al. (2021). Mussel-Inspired Bisphosphonated Injectable Nanocomposite Hydrogels with Adhesive, Self-Healing, and Osteogenic Properties for Bone Regeneration. *ACS Appl. Mat. Interfaces* 13, 32673–32689. doi:10.1021/acami.1c06058
- Wu, D. T., Munguia-Lopez, J. G., Cho, Y. W., Ma, X., Song, V., Zhu, Z., et al. (2021). Polymeric Scaffolds for Dental, Oral, and Craniofacial Regenerative Medicine. *Molecules* 26, 7043. doi:10.3390/molecules26227043
- Yu, Y., Chen, R., Yuan, Y., Wang, J., and Liu, C. (2020). Affinity-selected Polysaccharide for rhBMP-2-Induced Osteogenesis via BMP Receptor Activation. *Appl. Mater. Today* 20, 100681. doi:10.1016/j.apmt.2020.100681
- Yunus Basha, R., T.S., S. K., and Doble, M. (2015). Design of Biocomposite Materials for Bone Tissue Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* 57, 452–463. doi:10.1016/j.msec.2015.07.016

Conflict of Interest: Author DL was employed by company SILTISS.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Ahmed Omar, Amédée, Letourneur, Fricain and Fenelon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

OBJECTIFS

La première partie de ce manuscrit a permis de mettre en évidence les limites des membranes actuellement utilisées en pratique clinique pour la ROG. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de deux polysaccharides, le pullulane et le dextrane. Ces derniers sont utilisés soit séparément soit conjointement. D'après la revue systématique de la littérature, leur utilisation comme membrane barrière a été peu étudiée avec seulement une étude rapportant l'utilisation d'une membrane à base de pullulane pour la ROG.

L'objectif principal de cette thèse a été de développer une nouvelle membrane pour la ROG à partir de deux substances naturelles (pullulane et dextrane) dépourvues d'origine animale. Dans ce contexte, ce travail a été divisé en deux grandes parties :

1) Développement et comparaison de deux nouvelles membranes pour la régénération osseuse guidée

Dans cette première partie, nous nous sommes concentrés sur la création d'une membrane destinée à la ROG. Cette membrane était constituée d'une solution polymérique contenant deux polysaccharides, du pullulane et du dextrane, pouvant être associés à des microparticules d'hydroxyapatite. Deux formulations de membrane ont été évaluées : une membrane formée des deux polysaccharides seuls et une autre comprenant les deux polysaccharides combinés avec de l'hydroxyapatite. Des études pré-cliniques menées en site ectopique et orthotopique chez le rat nous ont permis de déterminer la formulation la plus adéquate en termes de biocompatibilité et de potentiel ostéogénique. Afin de comparer leur efficacité, une membrane commerciale à base de collagène a été utilisée comme contrôle.

2) Mise au point d'un modèle pré-clinique de défaut maxillaire chez le rat pour tester l'efficacité sur la régénération osseuse de la membrane en pullulane-dextrane-HA

D'après la revue de la littérature, nous avons constaté une hétérogénéité dans l'approche des modèles pré-cliniques utilisés pour l'évaluation des substituts osseux et des membranes, rendant difficile la comparaison d'un matériau à un autre. Nous avons également noté qu'une grande partie des études employaient un défaut de calvaria pour montrer les capacités ostéoconductrices de matériaux destinés à une utilisation en chirurgie orale et maxillo-faciale. Le modèle de calvaria n'est pas soumis à des contraintes mécaniques contrairement à la plupart des indications en chirurgie orale. Nous avons souhaité, dans un second temps, développer un modèle plus pertinent sur le plan clinique que le modèle de calvaria, pour tester l'efficacité de

la membrane renforcée avec des particules d'hydroxyapatite. Afin de reproduire au mieux les conditions physiologiques en chirurgie orale et d'apporter un modèle reproductible et peu coûteux, nous proposons, dans cette partie, le développement d'un défaut alvéolaire dans le maxillaire de rat. Un suivi par microscanner puis une évaluation histologique nous ont permis de suivre l'évolution de la réparation osseuse au niveau du défaut.

RÉSULTATS

4 Développement d'une membrane à base de pullulane/dextrane pour la régénération osseuse guidée

4.1 Introduction

Le développement d'une membrane à base de substances naturelles (collagène, chitosane...) représente un réel enjeu pour la régénération osseuse guidée. En pratique clinique, l'utilisation de membranes à base de collagène est très répandue notamment celles issues de tendon bovin (Cytoplast®), de derme porcin (Bio-Gide®) ou de derme humain (Alloderm®) [152]. Ces dernières peuvent néanmoins soulever des questions d'ordre éthique ou religieux et pourraient, en théorie, être responsables de la transmission d'agents infectieux.

Dans notre revue de la littérature, seule une étude s'est intéressée à l'utilisation d'un polysaccharide, le pullulane, comme potentielle membrane pour la ROG. Cette dernière fut implantée dans un défaut de calvaria chez le rat puis comparée à une membrane collagénique [80]. L'entreprise SILTISS a pour objectif de développer des biomatériaux biomimétiques d'origine non animale pour favoriser et soutenir les processus de régénération tissulaire. Dans ce contexte, un substitut osseux à base de pullulane et de dextrane combinés à des microparticules d'hydroxyapatite a été élaboré (GlycoBone®). Il se présente sous la forme de microbilles qui, une fois réhydratées, sont injectées sous forme d'une pâte non durcissante. De nombreuses études pré-cliniques ont démontré l'intérêt de ce nouveau substitut osseux dans différents sites d'implantation. En ROG, ces substituts osseux peuvent être associés avec une membrane. Afin de développer une gamme de produits applicables pour des procédures de ROG, le développement d'une membrane de formulation similaire permettrait d'associer ces deux dispositifs en chirurgie orale.

Les objectifs de ce premier article étaient de : i) développer une membrane à partir d'une solution polysaccharidique contenant du pullulane et du dextrane combinés ou non avec de l'hydroxyapatite et ii) de comparer *in vitro* et *in vivo* leur biocompatibilité ainsi que leur efficacité *in vivo* comme membrane pour la ROG afin de sélectionner la membrane la plus adaptée pour la régénération osseuse.

La production de deux formulations de membrane a été effectuée par l'entreprise SILTISS avec i) une membrane à base des deux polysaccharides seuls (Mb) et ii) une membrane à base des deux polysaccharides combinés avec de l'hydroxyapatite (Mb + HA). La cytotoxicité de ces formulations a été évaluée *in vitro* sur des cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse

humaine (hBMSCs). La biocompatibilité de ces formulations a été analysée *in vivo* dans un modèle d'implantation sous-cutanée selon les recommandations de la norme ISO 10993-6:2017. Enfin, le potentiel rôle barrière de ces formulations a été évalué dans un modèle de défaut non critique dans la diaphyse fémorale chez le rat. Dans chaque modèle animal, les membranes ont été comparées avec une membrane commerciale collagénique couramment utilisée, Bio-Gide®, produite par l'entreprise Geistlich.

4.2 Article n°2

Development of Novel Polysaccharide Membranes for Guided Bone Regeneration: In Vitro and In Vivo Evaluations

Naïma Ahmed Omar ¹, Jéssica Roque ¹, Paul Galvez ¹, Robin Siadous ¹, Olivier Chassande ¹, Sylvain Catros ^{1,2}, Joëlle Amédée ¹, Samantha Roques ³, Marlène Durand ³, Céline Bergeaut ⁴, Laurent Bidault ⁴, Paola Aprile ⁵, Didier Letourneur ^{4,5,*}, Jean-Christophe Fricain ^{1,2,3} and Mathilde Fenelon ^{1,2}

¹ University of Bordeaux, INSERM 1026, Tissue Bioengineering, F-33076 Bordeaux, France; naima.ahmed-omar@u-bordeaux.fr (N.A.O.); jessica.pina-de-roque@inserm.fr (J.R.); paul.valgez@gmail.com (P.G.); robin.siadous@inserm.fr (R.S.); olivier.chassande@inserm.fr (O.C.); sylvain.catros@u-bordeaux.fr (S.C.); joelle.amedee@inserm.fr (J.A.); jean-christophe.fricain@inserm.fr (J.-C.F.); mathilde.fenelon@u-bordeaux.fr (M.F.)

² University Hospital of Bordeaux, Department of Oral Surgery, F-33076 Bordeaux, France

³ University Hospital of Bordeaux, INSERM, CIC 1401, F-33000 Bordeaux, France; samantha.delmond@chu-bordeaux.fr (S.R.); marlene.durand@chu-bordeaux.fr (M.D.)

⁴ Siltiss, SA, Zac de la Nau, 19240 Saint-Viance, France; c.bergeaut@silab.fr (C.B.); l.bidault@silab.fr (L.B.)

⁵ University Paris Cité & Sorbonne Paris Nord, INSERM 1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), X Bichat Hospital, F-75018 Paris, France; paola.aprile@gmail.com

* Correspondence: didier.letourneur@inserm.fr

Abstract: Introduction: Guided bone regeneration (GBR) procedures require selecting suitable membranes for oral surgery. Pullulan and/or dextran-based polysaccharide materials have shown encouraging results in bone regeneration as bone substitutes but have not been used to produce barrier membranes. The present study aimed to develop and characterize pullulan/dextran-derived membranes for GBR. Materials and methods: Two pullulan/dextran-based membranes, containing or not hydroxyapatite (HA) particles, were developed. In vitro, cytotoxicity evaluation was performed using human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs). Biocompatibility was assessed on rats in a subcutaneous model for up to 16 weeks. In vivo, rat femoral defects were created on 36 rats to compare the two pullulan/dextran-based membranes with a commercial collagen membrane (Bio-Gide®). Bone repair was assessed radiologically and histologically. Results: Both polysaccharide membranes demonstrated cytocompatibility and biocompatibility. Micro-computed tomography (micro-CT) analyses at two weeks revealed that the HA-containing membrane promoted a significant increase in bone formation compared to Bio-Gide®. At one month, similar effects were observed among the three membranes in terms of bone regeneration. Conclusion: The developed pullulan/dextran-based membranes evidenced biocompatibility without interfering with bone regeneration and maturation. The HA-containing membrane, which facilitated early bone regeneration and offered adequate mechanical support, showed promising potential for GBR procedures.

Keywords: guided bone regeneration; bioresorbable membrane; polysaccharide; pullulan; dextran; in vivo

Citation: Ahmed Omar, N.; Roque, J.; Galvez, P.; Siadous, R.; Chassande, O.; Catros, S.; Amédée, J.; Roques, S.; Durand, M.; Bergeaut, C.; et al. Development of Novel Polysaccharide Membranes for Guided Bone Regeneration: In Vitro and In Vivo Evaluations. *Bioengineering* **2023**, *10*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s): Name

Received: 1 September 2023

Revised: 16 October 2023

Accepted: 20 October 2023

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Guided bone regeneration (GBR) procedure has been widely used for its successful and reliable outcomes to repair damaged bone in various clinical indications (i.e., oral or orthopedic bone defects caused by infection, malformation, traumatism, or tumor) [1,2]. This procedure relies on the use of a membrane that is applied between the surrounding soft tissue and the bone defect [3]. This barrier membrane prevents soft tissue invasion into the bone defect area, thereby allowing osteoprogenitor cells to preferentially fill the bone defect and proliferate to achieve bone regeneration [4].

GBR membranes may require several criteria for optimal bone regeneration such as (i) biocompatibility, (ii) space maintaining, (iii) appropriate resorption time, and (iv) easy handling and shaping [5,6]. Two main types of GBR membranes can be used in clinic: non-resorbable and resorbable membranes [4,7,8]. Despite the wide choice of existing barrier membranes available on the market, they all showed limitations. Non-resorbable synthetic membranes provide good mechanical strength to maintain bone growing space. However, they must be removed at a later stage, which entails risks of morbidity and pain for patients. In addition, membrane exposure is often reported to lead to bacterial contamination and subsequent infection [5,9]. To overcome these issues, resorbable membranes, from synthetic or natural components can be used. Unfortunately, their resorption rate and poor mechanical properties, leading to membrane collapsing, are often considered limiting factors in their use by surgeons [10].

One of the most commonly used resorbable membranes is made from collagen [11,12]. Collagen membranes are frequently of bovine or porcine origin. Nowadays, animal-derived membranes could be a risk for safety and a serious limitation for patients having moral commitments [13]. The need to develop new membranes for GBR applications is thus critical, and the use of natural animal-free polymers can even avoid ethical concerns [7,14,15].

Polysaccharides are one type of natural polymers composed of glucosidic units [16] and their application in tissue engineering is emerging [17–19]. In particular, pullulan and dextran are two polymers that showed promising results in the field of bone regeneration since they share similarities with bone extracellular matrix components. Their use in a mixed composition (75% Pullulan, 25% Dextran) as bone graft substitutes containing the mineral component hydroxyapatite (HA) has been extensively investigated [20–24]. These polysaccharides are used as injectable hydrogels (microbeads) that easily fit the bone defect. Pullulan/dextran-based microbeads have shown great osteogenic properties in vivo using a femoral condyle defect in rats, and in sinus floor augmentation procedures in sheep [20–22]. It has also been established that these materials, free from osteogenic cells, are able to retain growth factors, thus boosting osteogenesis [19].

To our knowledge, only one study by Miyahara et al. suggested the use of pullulan to provide a barrier membrane for GBR application [19,25]. Compared to a commercially available collagenic membrane, the pullulan-derived membrane showed higher bone formation after four weeks in a mice calvaria bone defect. Despite these promising results, no studies have investigated the production of a membrane derived from both pullulan and dextran biomaterials [19]. The aim of this study was to develop and characterize in vitro and in vivo two different formulations of pullulan/dextran-based membranes for GBR applications.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Membranes were molded (15 cm length and width, 500 μm depth) as porous materials for guided bone regeneration according to an extensively published patented protocol for porous polysaccharide-based scaffold fabrication [20–22]. Briefly, 75% pullulan/25% dextran solutions mixed with sodium trimetaphosphate (2.5%) as a crosslinker were poured on a plate and freeze-dried to obtain films as previously described for porous discs, cylinders, or conical scaffolds. In this study, macro-sized hydroxyapatite particles were dispersed or not into the solutions of polysaccharides to obtain two new pullulan/dextran-based membranes (Mb) with or without hydroxyapatite particles (Mb and Mb + HA).

To visualize the microstructure of both Mb and Mb + HA, scanning electron microscopy was performed. Each side of the freeze-dried membranes was first coated with a thin layer of gold before being observed using a scanning electron microscope (TM4000Plus, Hitachi, Japan) at an accelerating voltage of 15 kV.

The mechanical properties of both membranes were investigated using nanoindentation assessment. First, membranes shaped into 6 mm circles and were hydrated 72 h in physiological serum (0.9% NaCl) prior to measurements. Local Young's moduli were computed for each side of the membranes and repeated on three different samples (for each membrane). Local mechanical properties of membranes were measured with a Piuma Nanoindenter (Optics11, Amsterdam, The Netherlands), using an optical fiber connected to an interferometer and linked to a spherical probe (stiffness: 0.47 N.m^{-1} ; tip radius: $102 \mu\text{m}$) to acquire force–displacement curves. To measure the Young's modulus of the membranes, the probe was immersed for $6 \mu\text{m}$ into the sample at each point of measurement (25 points for each side and sample). The Young's modulus for each point was computed according to the Hertz contact model for a spherical body indenting a flat surface, using the built-in Piuma software (version 2.5.0), and the given mean of elastic modulus values was assessed.

2.2. *In Vitro* Cytotoxicity Assays

Human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) were used for indirect cytotoxicity studies following the ISO standard 10993-5:2009 [26]. The hBMSCs were isolated from consenting patients who had undergone hip surgery and expanded according to well-established protocols [27]. Cells were used at passage 2 for this study and cultured in α -Minimum Essential Medium (α -MEM, GIBCO®) under a controlled atmosphere (5% CO_2). Sample extracts (Mb and Mb + HA), positive and negative controls were prepared according to the ISO standard 10993-12:2021 [28]. Briefly, 0.1 g of the membrane (corresponding approximately to a square of $1 \times 1 \text{ cm}^2$) was incubated in 1 mL of α -MEM supplemented with 10% (*v/v*) fetal bovine serum for 72 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 . The negative control was the α -MEM and the positive control was prepared using α -MEM medium with 20% dimethyl sulfoxide (DMSO). The obtained supernatants were then placed in contact with the hBMSCs ($3 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$) for 24 h in 96-well plates to assess cell viability and metabolic activity ($n = 6$ per condition).

Cell viability was performed using a Neutral Red (NR) test. Culture medium was removed from the plate and $50 \mu\text{L}$ of NR solution (diluted at 1.25% in IMDM medium) was added in each well and incubated for 3 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 . Supernatants were removed and wells were washed with HBSS (GIBCO®) to remove the excess of NR solution. Cells were lysed with 1% acetic acid in 50% ethanol. The resulting optical density (OD) values were read at 540 nm using a spectrophotometer (Varioskan Lux, Thermoscientific, United States).

Metabolic activity was assessed using 3-[4,5-dimethyltriazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. As previously described for the NR test, the culture medium was removed and $100 \mu\text{L}$ of MTT solution (prepared from a stock solution of 5 mg/mL in 0.1 M PBS and diluted at 20% in IMDM medium without phenol red) was added in each well. After 2 h of incubation at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ under a controlled atmosphere, supernatants were discarded and $100 \mu\text{L}$ of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the wells to dissolve the formed crystals. To read the OD values, the plate was read at 570 nm using a spectrophotometer (Varioskan Lux, Thermoscientific, United States).

For each assay, results of each condition were normalized to negative controls (cells cultured in α -MEM) as follows: $\text{OD} = (\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}}) \times 100$.

2.3. *In Vivo* Experiments

The two rat experimental procedures followed the principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and approved by the Animal Care and Experiment Committee of the University of Bordeaux, Bordeaux, France. Experiments were carried out in an accredited animal facility following European recommendations for laboratory animal care (directive 86/609 CEE of 24/11/86).

2.3.1. Biocompatibility Assessment

- Surgical procedure:

A rat subcutaneous model was first used to assess the biocompatibility of the two different membrane formulations—Mb and Mb + HA. They were also compared to a commercially available and widely used collagen membrane (Bio-Gide®, Geistlich France) for GBR procedures. This study was approved by the French Ethics Committee under APAFIS n°2016030408537165v4. Fifteen Sprague Dawley male rats (11 weeks old) were used for subcutaneous implantation. Analgesia was provided by intraperitoneal injection of buprenorphine (0.05 mg/kg body weight, Buprécare®, Axience, Belgium) and rats were anesthetized by inhalation of isoflurane (induced with 4% and maintained at 2%). The back of the rats was shaved and disinfected with Betadine. Four horizontal incisions of 1 cm in length were made in the rat's back and dorsal subcutaneous pockets were created via dissection. Within the same rat, four conditions were attributed to the subcutaneous pockets: (1) Mb, (2) Mb + HA, (3) Bio-Gide®, and (4) a sham-operated site. All membranes were shaped as 1 × 1 cm² squares and hydrated in 0.9% NaCl for 5 min before implantation. Finally, the skin was closed with surgical clips and an antiseptic spray (Aluspray®, Vétquinol, Lure, France) was applied to the scar. After surgery, food and water were supplied ad libitum. At 1, 4, and 16 weeks, rats were sacrificed (*n* = 5 per condition and per time) by carbon dioxide overdose. Subcutaneous implants were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4 °C.

- Histological analysis:

Samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol baths before paraffin embedding. Transversal cutting of rat skin was performed to obtain 7 µm slices. Two slides per condition were stained via HES staining and the images were acquired on a slide scanner (Nano-zoomer 2.0, Hamamatsu Photonics, France). Biocompatibility was assessed following the ISO standard 10993-6:2016 [29] by a blinded independent trained investigator. Inflammatory reaction was scored around the implants semi-quantitatively. This score was computed by investigating the cell type/response and the tissue response: cellular infiltration and inflammatory cell type (polymorphonuclear cells, lymphocytes, macrophages, plasma cells, and giant cells), vascularization, fatty infiltration, and extent of fibrosis. Membranes were compared to the sham-operated control samples and were considered as non-irritant for a score from 0.0 up to 2.9, slightly irritant (3.0 up to 8.9), moderately irritant (9.0 up to 15.0) or severely irritant (>15) to the tissue [30]. Finally, membrane resorption was assessed based on membrane thickness measurements over time using histological sections on the NDP-View software version 2.0 (Hamamatsu Photonics, France).

2.3.2. Femoral Defect Implantation

- Surgical Procedure:

The potential of these polysaccharide membranes (Mb and Mb + HA) to act as a barrier for GBR procedures was assessed using a non-critical femoral bone defect model [31]. Additionally, they were compared to Bio-Gide® (Geistlich France). The study was approved by the French Ethics Committee under APAFIS n° 32504-2021072111152646v4. Thirty-six Sprague Dawley male rats (11 weeks old) were used for the femoral defect implantation (two defects per rat). Briefly, both legs of each rat were shaved and disinfected with Betadine. Analgesia was given via intraperitoneal injection of buprenorphine (0.05 mg/kg body weight, Buprécare®), and rats were anesthetized via inhalation of isoflurane (induced with 4% and maintained at 2%). A longitudinal skin incision was made laterally across both legs, and muscles were dissected to expose the femoral diaphysis. The periosteum was removed manually. A 2.3 mm bone defect was then drilled under irrigation. The defect was either left empty or covered by a membrane: (1) Mb, (2) Mb + HA, and (3) Bio-Gide® (Geistlich France). Membranes were shaped as 2 × 1 cm² rectangles to cover the whole femur and recut if necessary. They were maintained over the defect using a resorbable suture thread (4-0 Vicryl®, Ethicon, division of Johnson & Johnson, Brussels,

Belgium). A suture thread was also applied for the empty defect for consistency. The muscles were subsequently repositioned and sutured with absorbable sutures (4-0 Vicryl®), and the skin was closed with surgical clips. An antiseptic spray (Aluspray®) was applied to the scar. After surgery, food and water were supplied ad libitum. Animals were sacrificed at 1, 2, and 4 weeks post-operation ($n = 6$ femurs per condition and per time) and fixed overnight in PFA 4% at 4 °C.

- Radiographic analysis:

Micro-computed tomography (Quantum FX Caliper, Life Sciences, Perkin Elmer, United States) was performed ex vivo on femurs. The X-ray source was set at 90 kV and a current of 160 μ A used to obtain a 10 μ m resolution (field of view: 5 mm). After scanning, visualization of the cross-sectional slices was performed using the VGSTUDIO MAX® software (version 2022.3, Volume Graphics, Heidelberg, Germany). To assess bone volume fraction (BV/TV, ratio between bone volume and total volume), 3D images were oriented to face the defect (coronal view). Then, a 2.3 mm-diameter, 550 μ m-depth cylindrical volume of interest, corresponding to the initial surgical defect, was created. Each scan was reconstructed using the same calibration system to distinguish bone and air.

- Histological analysis:

Each sample was decalcified with EDTA-based Microdec® (Diapath, MM Brignais, France) decalcifiant for three weeks under gentle agitation. Samples were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol baths and processed for embedding in paraffin. Sagittal cuts of rat femoral bones were made to obtain 7 μ m-thick serial sections in the middle of the defect. First, slides were stained with Masson–Goldner’s trichrome staining to perform histomorphometric analysis of newly formed bone. Then, slides were stained using picrosirius red staining to analyze the collagen fibers’ orientation under polarized light microscopy (Widefield microscope DM 5000, Leica, France). Orientation was assessed inside the defect and computed using the OrientationJ plug-in (ImageJ) to measure the main direction of the fibers [32]. This criterion was evaluated by computing the coherency that shows if the local image features are orientated or not (expressed here in percentage—0% indicates the image is isotropic and 100% indicates that the image has one dominant orientation).

2.4. Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm SD and “ n ” indicated the number of membranes tested. The GraphPad Prism Software 8.2.1. (La Jolla, CA, USA) was used to perform statistical analysis. A normality was first performed using a D’Agostino and Pearson omnibus normality test. Statistical significance between several groups was assessed via one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test for data assuming a Gaussian distribution. Differences for independent samples were evaluated with the non-parametric Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison test. The non-parametric Mann–Whitney test (two-tailed) was used to compare two groups. Differences were considered significant and indicated with a star when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), and $p < 0.0001$ (****).

3. Results

3.1. Materials

The morphology of the Mb and Mb + HA membranes as well as the collagenic membrane (Bio-Gide®) was observed using scanning electron microscopy (Figure 1). Bio-Gide® demonstrated a bilayered structure with a smooth side composed of compact collagen fibers and a rough side with a fibrous open-pored pattern. Concerning Mb and Mb + HA, these porous pullulan/dextran 3D scaffolds have been extensively described by our team [33–38]. Both freeze-dried membranes have small pores (10–20 μ m) on the smooth side. Mb is highly porous on the other side (i.e., rough side), as previously reported [34], with

a mean pore size of 200–300 μm (Figure 1, middle row). The addition of HA influenced the crosslinking and pore formation resulting in smaller pores (30–80 μm) on the rough side for Mb + HA (Figure 1, bottom row) [23]. The pores are elongated with a mean Feret shape around 2 [35]. This allows the penetration of individual osteoblasts or larger spheroids [36,37]. Experimental and numerical simulations of the oxygen transport evidenced that the oxygen diffusion coefficient ($D = 1.6 \pm 0.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) in the polysaccharide scaffolds was favorable for cell viability [35]. Additionally, the degradation kinetics *in vivo* can be tuned to parallel the tissue regeneration [38,39]. Moreover, the mechanical properties of these membranes are in the range of connective tissues of mammals [38,39]. Surface mechanical properties of the membranes were evaluated here by nanoindentation. Both membranes showed comparable Young's moduli regardless of the side of the membrane (values comprised between 4.73 and 8.95 kPa). These results are consistent with elastic moduli computed for the Bio-Gide® membrane reinforcing the potential used of these pululan/dextran membranes for GBR application.

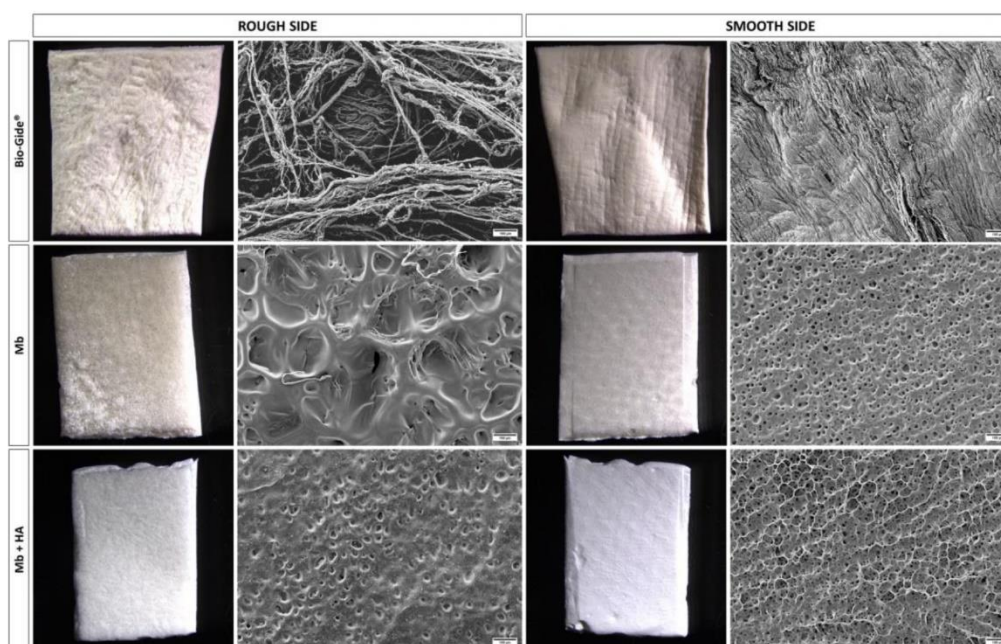


Figure 1. Membranes morphology. Macroscopic pictures of membranes showing the two sides of the materials and their corresponding SEM images (scale bar: 100 μm).

3.2. *In Vitro* Cytocompatibility

Cell viability was carried out via MTT and Neutral Red assays (Figure 2). No cytotoxic effect was observed for both formulations, Mb and Mb + HA, since cell viability was up to 70% according to the ISO standard 10993-5 [26] and compared to the negative control (i.e., standard cell culture medium) (Figure 2a). Similar results were obtained for the evaluation of metabolic activity (Figure 2b). Mb and Mb + HA were considered non-cytotoxic, which is a necessary validation criterion before implanting them *in vivo*.

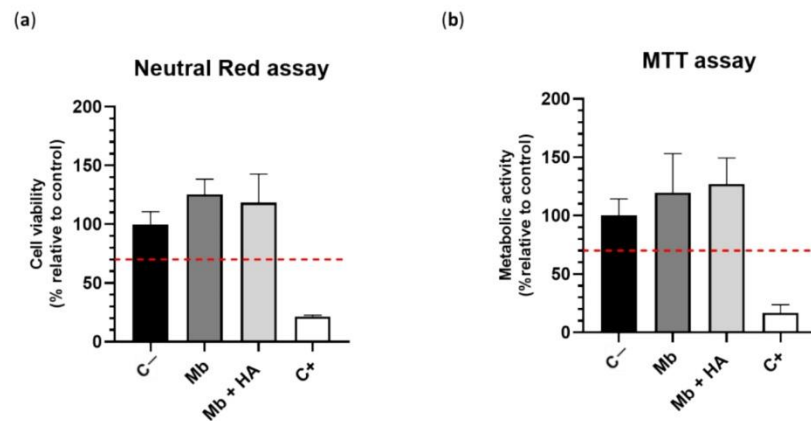


Figure 2. Cytotoxic effect of the membranes in vitro on hBMSCs according to the ISO standard 10993-5 ($n = 6$ /condition); (a) MTT assay; (b) Neutral red assay; C- negative control, C+ positive control. The red dotted horizontal lines corresponded to the cytocompatibility threshold.

3.3. In Vivo Experiments

3.3.1. Biocompatibility

Four conditions (Sham, Bio-Gide[®], Mb, and Mb + HA groups) in a rat subcutaneous model at different time points (1, 4 and 16 weeks) were evaluated (Figure 3a). A total of 97 samples were analyzed to evaluate the inflammatory reaction score following the ISO standard 10993-6 [29] using HES staining (Figure 3a). A blinded independent trained investigator evaluated cell type and tissue responses. After 1 week of implantation, a slight inflammatory reaction was observed for the three different membranes compared to the sham-operated control (Figure 3a). A fibrotic capsule appeared around the implants for Mb and Mb + HA at 1 week. It became thinner and compact after 4 weeks suggesting that it stabilized. For the Bio-Gide[®] membrane, the slight inflammatory reaction remained at 4 weeks, whereas Mb and Mb + HA were considered as non-inflammatory at 4 weeks. A progressive cellular infiltration inside the Bio-Gide[®] membrane was also observed, whereas no cell infiltration was noticed for Mb or Mb + HA. All membranes were non-irritant 16 weeks post-operation and were still visible in the subcutaneous tissue. Based on these findings, the inflammatory reaction score (Figure 3b) confirmed that Mb and Mb + HA were considered biocompatible biomaterials.

Membrane thicknesses were measured to estimate their resorption over time (Figure 3c). Mb resorbed quickly up to 31.8% between 1 and 4 weeks but remained stable until 16 weeks (compared to 1 week). Mb + HA showed the slowest rate of resorption with a resorption rate of 10.8% between 1 and 4 weeks and up to 13.1% at 16 weeks. We also observed that the Bio-Gide[®] membrane resorbed faster and to a greater extent over time (25.8% at 4 weeks, and 40% at 16 weeks).

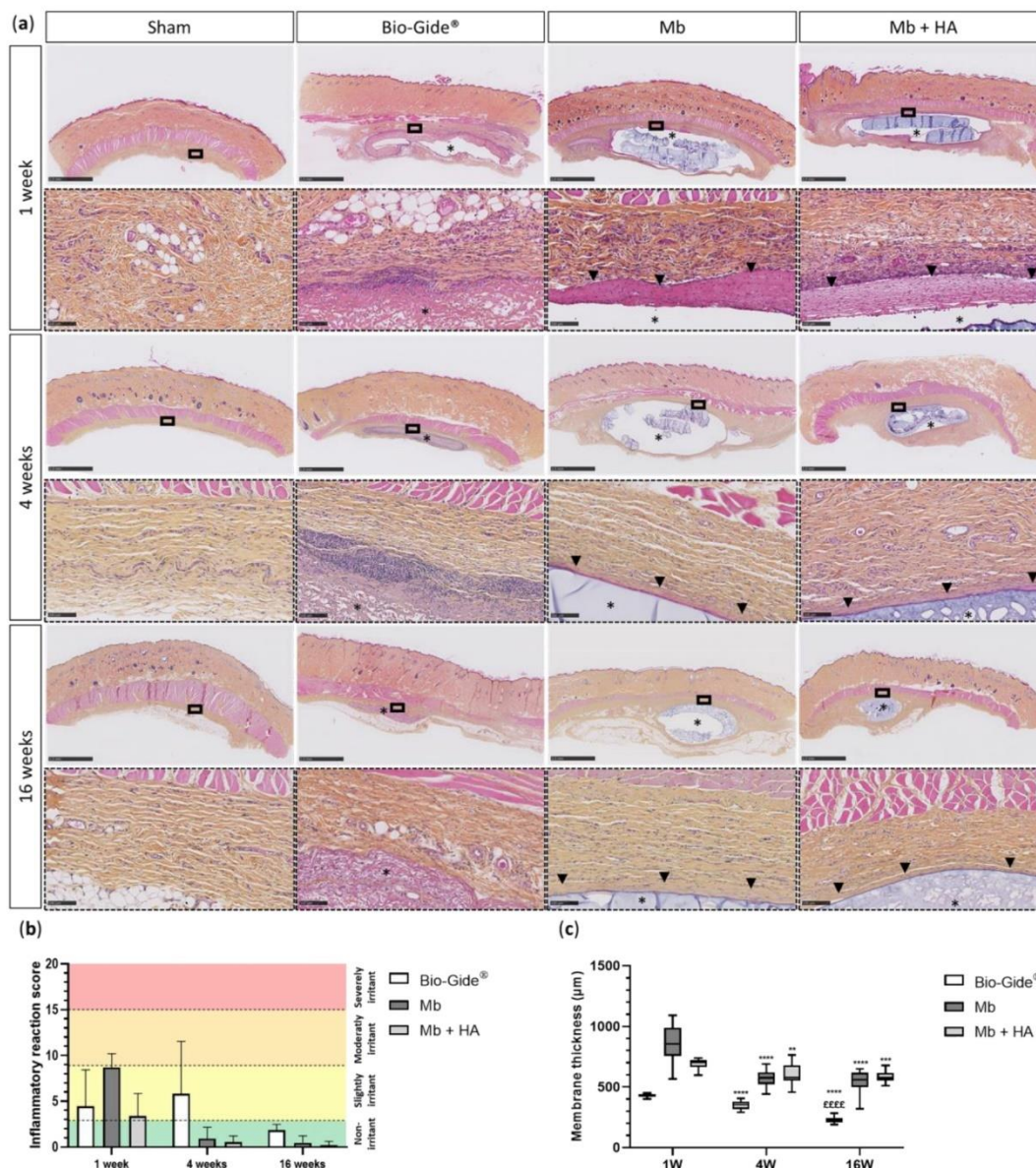


Figure 3. Assessment of biocompatibility using a rat subcutaneous model. (a) Histological section of subcutaneous implantation of the membranes via HES staining (low magnification, scale bar: 2.50 mm; high magnification, scale bar: 100 µm); black asterisks represent the remaining membrane ($n = 6-10$ per condition and timepoint), black arrowheads represent the thin fibrotic layer; (b) inflammatory reaction scores of the corresponding membranes; (c) thickness measurement over time, one-way ANOVA, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$, $**** p < 0.0001$ compared to 1 week; $££££ p < 0.0001$ compared to 4 weeks.

3.3.2. Bone Regeneration of Femoral Defects

Then, the osteogenic properties of membranes and their ability to act as a barrier were investigated in a non-critical size femoral defect among 36 rats. Micro-CT was performed after 1, 2, and 4 weeks of implantation for the four groups (Empty, Bio-Gide®, Mb, and Mb + HA) (Figure 4a). Bone regeneration (BV/TV) was quantified at 1, 2, and 4 weeks after the surgery using micro-CT analysis (Figure 4b). At 1 week after the surgery, no differences were observed between conditions (1 week BV/TV [%]: Empty = 11.62 ± 6.76 , Bio-Gide® = 6.87 ± 4.61 , Mb = 12.79 ± 6.91 , and Mb + HA = 12.79 ± 11.50).

Both polysaccharide membranes revealed a comparable BV/TV as well as the empty defect 2 weeks post-operation. However, bone regeneration was significantly enhanced when the defect was covered with Mb + HA compared to Bio-Gide® (2 weeks BV/TV [%]: Empty = 45.83 ± 14.65 , Bio-Gide® = 28.22 ± 12.78 , Mb = 44.88 ± 16.48 , and Mb + HA = 50.88 ± 12.69 , $p < 0.05$). The late time point (4 weeks) did not enable the differentiation of the four conditions (4 weeks BV/TV [%]: Empty = 61.55 ± 11.73 , Bio-Gide® = 59.65 ± 15.06 , Mb = 58.19 ± 8.40 , and Mb + HA = 49.65 ± 10.74).

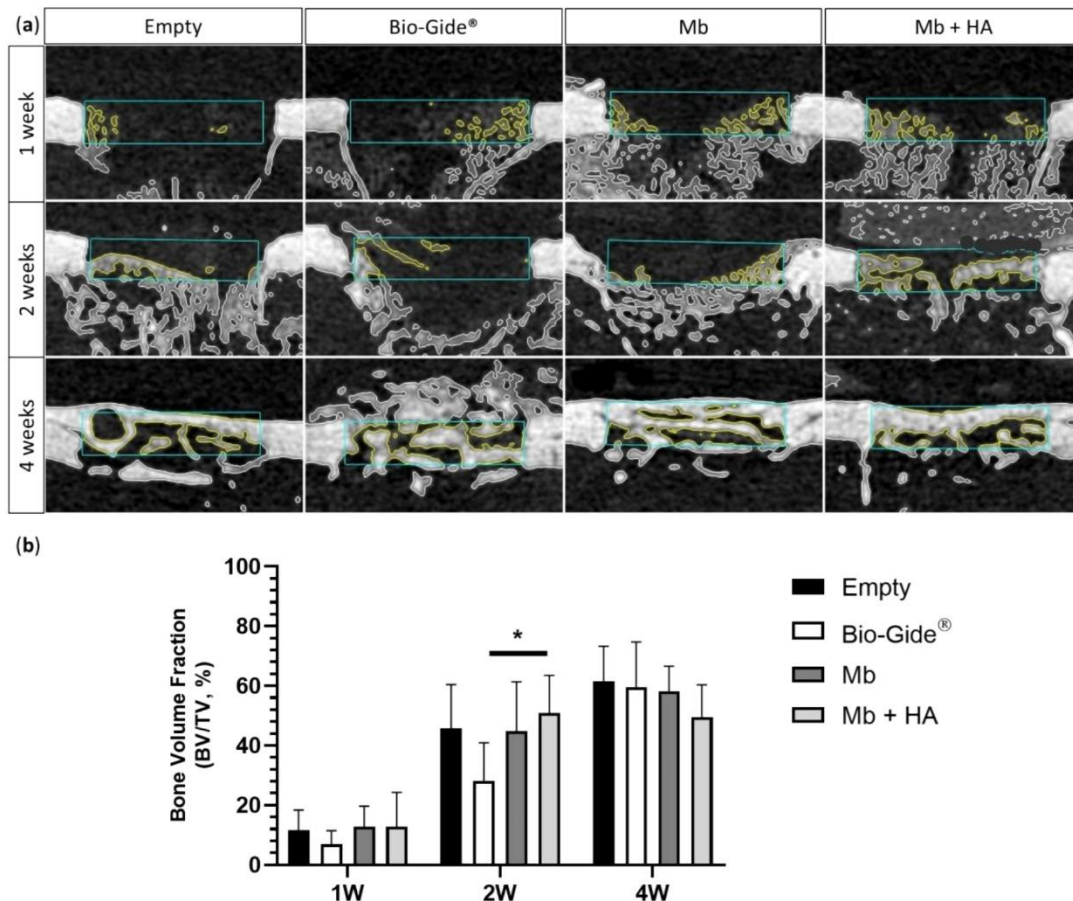


Figure 4. Rat femoral bone defect performed in the middle of the diaphysis. (a) 2D micro-computed tomography scans showing approximately in the middle of the defect, the blue rectangles represent the analyzed volume of interest; (b) bone volume fraction measurement using VGSTUDIO MAX software version 2022.3 ($n = 6$ per condition and time, except for Mb + HA at 2 weeks and Bio-Gide® at 4 weeks, $n = 5$), Mann–Whitney test * $p < 0.05$.

Histomorphometric analysis of Masson–Goldner’s trichrome staining was consistent with the micro-CT results and supported new bone formation inside the defect previously observed (Figure 5). Macroscopically, histological sections revealed that Mb and Bio-Gide® tended to collapse inside the defect (Figure 5a), thereby reducing the bone healing space at the earliest stages of bone regeneration. This phenomenon was not observed with Mb + HA. Similar amounts of newly formed bone were observed after 1 week for the two polysaccharide membranes and the commercial membrane compared to the defect left empty (1 week newly formed bone [%]: Empty = 14.50 ± 7.85 , Bio-Gide® = 15.34 ± 5.69 , Mb = 14.63 ± 3.94 , and Mb + HA = 12.02 ± 3.41). The two polysaccharide membranes revealed a comparable amount of bone, as well as the empty defect two weeks after the surgery, compared to Bio-Gide® membrane (2 weeks newly formed bone [%]: Empty = 41.09 ± 10.59 , Bio-Gide® = 28.36 ± 8.63 , Mb = 46.62 ± 16.66 , and Mb + HA = 42.88 ± 11.15). For the late time

point, newly synthesized bone appeared well-organized with lamellar structure (i.e., parallel fibers) for the polysaccharide-based membrane conditions. To highlight this finding, bone quality at 4 weeks was assessed using picosirius red staining to evidence fiber orientation and ultimately bone maturation (Figure 6). Fiber orientation was analyzed by reporting its coherency. Host bone was used as a reference for well-organized lamellar structure with coherency around 35% showing organized collagen fibers. The quality of newly formed bone was thus compared to the host bone.

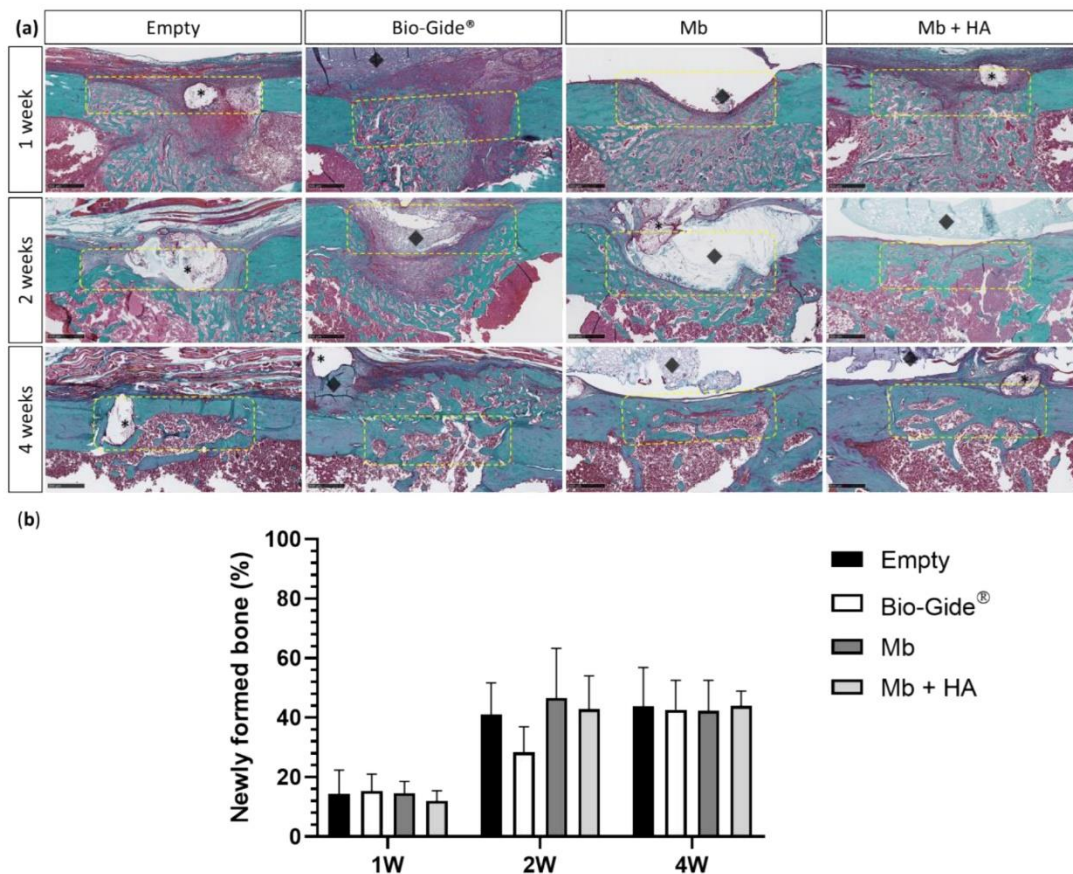


Figure 5. Histological analysis of the rat femoral bone defects for all groups (Empty, Bio-Gide®, Mb and Mb + HA) at 1 week, 2 weeks, and 4 weeks of explantation. (a) Masson–Goldner’s staining of the slides for the defects left empty or covered by a membrane (scale bar: 500 μm). Black asterisks represented the suture thread, the yellow dotted rectangles the bone defect, and black diamonds the remaining membrane; (b) histomorphometric analysis of the corresponding histological sections for newly formed bone.

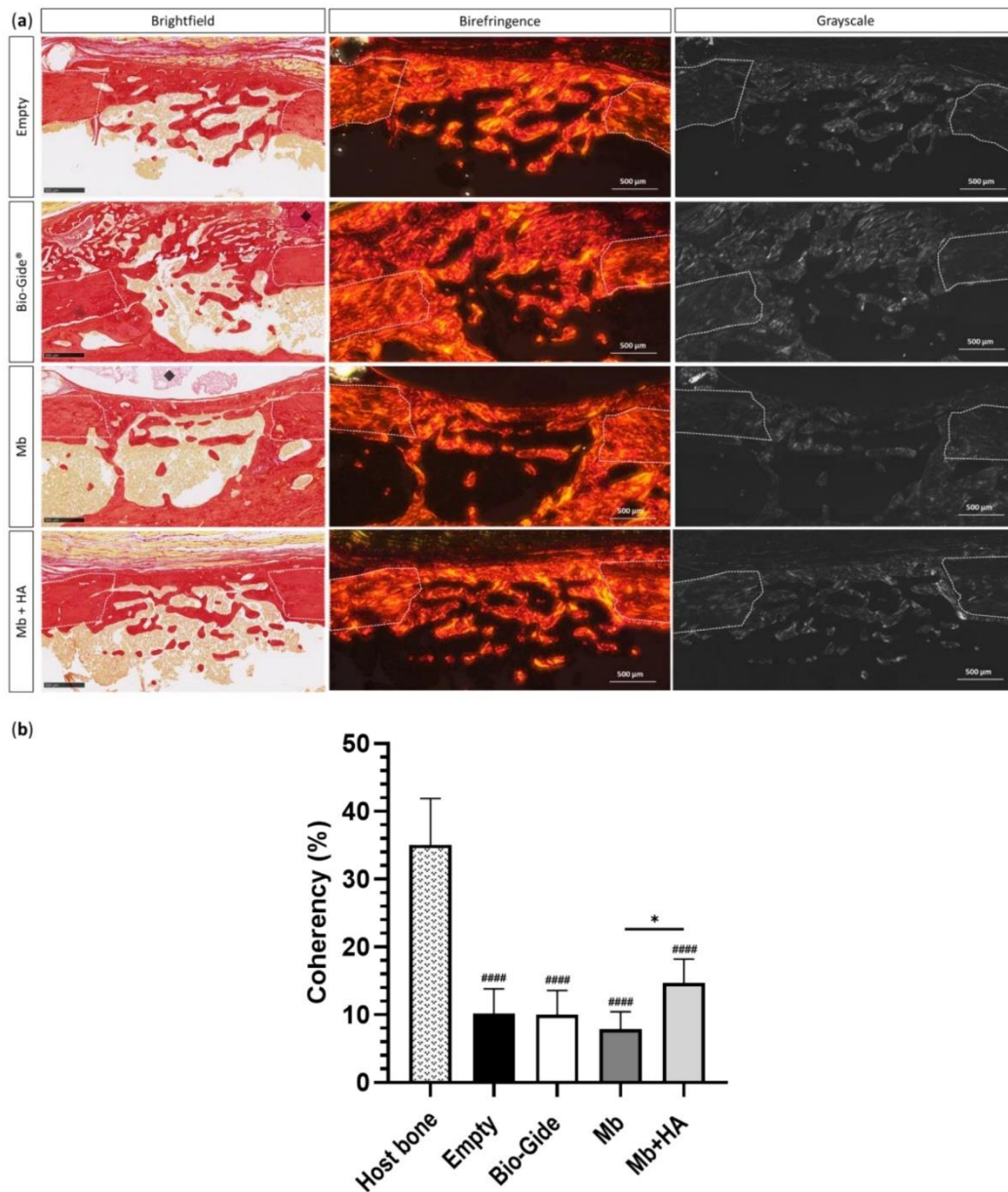


Figure 6. Picosirius red staining of rat bone femoral defects for all groups (Empty, Bio-Gide®, Mb and Mb + HA) at 4 weeks. (a) Histological sections under brightfield view and polarized light view (birefringence and grayscale modes) of the slides for the defects left empty or covered by a membrane (scale bar: 500 μm). White dotted lines represented the edges of the defect, and the black diamonds represented the remaining membrane; (b) histomorphometric analysis of the corresponding histological sections. Collagen fibers orientation using OrientationJ plug-in (ImageJ), * $p < 0.05$, #### $p < 0.0001$, compared to host bone.

Covering the defect with Mb + HA resulted in the formation of bone with significantly better fiber orientation and organization compared to Mb alone ($p < 0.05$) with a coherency up to $14.68 \pm 3.52\%$ and $7.83 \pm 2.62\%$, respectively. Comparable fibers orientation was seen for Bio-Gide® and Empty groups (Coherency [%]: Empty = 10.13 ± 3.67 and Bio-Gide® = 10.03 ± 3.54).

4. Discussion

Nowadays, resorbable membranes are widely used to overcome the major disadvantages of non-resorbable membranes for GBR. These membranes are mainly derived from animals (*e.g.*, collagen) making them unfit to use in patients with moral constraints [13]. Additionally, their poor mechanical stability and uncontrolled degradation rates are a limitation [40]. The present study aimed to characterize the biocompatibility and the osteogenic potential of two natural membranes for GBR procedures made from pullulan and dextran and containing or not HA. Dextran and pullulan are two natural exopolysaccharides that have already been used for medical purposes [15,19]. The association of both polysaccharides to design bone substitutes showed promising results in the field of bone regeneration [23]. This is the first study to design pullulan/dextran-derived membranes and assess their *in vitro* and *in vivo* performances for GBR application.

Four requirements to assess successful GBR were described by Wang *et al.* and are known under the "PASS" principles: (i) primary wound closure, (ii) angiogenesis for adequate blood supply, (iii) space maintenance of newly formed bone, and (iv) wound stability to allow blood clot formation [7,41].

When considering a material for human implantation, biocompatibility is one of the most important factors to be ensured. Polysaccharides are one type of natural polymers that show high biocompatibility and similar structure compared to extracellular components [42]. The performance of the pullulan/dextran membranes was assessed *in vitro* for their cytotoxicity and *in vivo* on ectopic and orthotopic rat models. First, the cytocompatibility of both membranes was evaluated *in vitro* on hBMSCs to closely reproduce clinical conditions. Both pullulan/dextran-derived membranes were cytocompatible. This is consistent with results obtained from previous studies where hBMSCs were seeded on pullulan/dextran-derived scaffolds with successful proliferation rate for up to 15 days [21].

To further investigate their biocompatibility, a rat subcutaneous implantation model was then conducted. The *in vivo* subcutaneous implantation model is known to provide critical information on the host tissue reaction of barrier membranes, as well as their tissue integration patterns, by assessing cellular infiltration, vascularization, and degradation [43]. Blinded histological analysis revealed that both polysaccharide membranes showed slight acute inflammatory reaction after one week, and were considered as non-irritant four weeks after implantation, thereby indicating their biocompatibility. This is corroborated by a previous study that investigated the biocompatibility of hydrogels with varying concentrations of dextran and pullulan [44]. In that study, a noticeable inflammation was observed 30 days after implantation when pullulan was implanted alone, whereas the implantation of dextran-based hydrogel alone led to a higher fibrous capsule formation that could induce post-implantation pain for patients [45]. Interestingly, the study highlighted the interest of combining pullulan and dextran to improve the biocompatibility by decreasing the foreign body reaction. Thus, the ratio of 75/25 for pullulan and dextran, respectively, provided the best candidate for further investigations.

A slowest resorption rate was observed with the pullulan/dextran-derived membranes compared to the commercial collagen membrane. This finding was also supported by previous studies reporting the tendency of collagen membranes to quickly resorb [43,46–48]. A possible explanation is the progressive cellular infiltration observed inside the Bio-Gide® membrane, whereas no cell infiltration was observed inside Mb and Mb + HA. Membranes were designed to act as a physical barrier to prevent surrounding tissue invasion inside the defect.

Moreover, both pullulan/dextran-derived membranes remained up to 16 weeks after implantation, thereby making them attractive candidates for GBR procedure since clinical requirements specified their need for space maintenance between 16 and 24 weeks [1,10]. It should be emphasized that the pullulan/dextran membrane containing HA showed the lowest resorption rate. As previously reported by Piattelli *et al.*, it could be explained by the addition of the mineral component (HA), thereby providing a slowest degradation to the polysaccharide membrane containing HA [49]. Despite its proven stability until 16

weeks, the membrane degradability must be assessed using longer timepoints (e.g., 6 to 12 months).

The potential osteogenic properties of the membranes were then investigated using a rat mono-cortical femoral bone defect. Both quantitative and qualitative bone formation analyses were performed. The results showed a significant enhancement of early bone regeneration using a pullulan/dextran-based membrane containing HA compared to the commercial membrane Bio-Gide® due to better mechanical support. Indeed, the progressive mineralization of Mb + HA may increase its ability to support bone ingrowth and avoid the collapsing of the surrounding tissues. Huang et al. highlighted in a study the improvement of the mechanical properties of a chitosan membrane incorporated with chitosan microspheres loaded with in situ HA [50]. An investigation of the membrane mechanical properties *ex vivo* could provide valuable information to demonstrate the space maintenance capacity of Mb + HA as one of the main biological features desired for GBR procedure [41]. We also observed during the surgical procedure that Mb + HA was easier to handle and manipulate. We thus hypothesized that Mb + HA might offer better space-maintaining ability, thereby favoring an increase in bone formation.

This hypothesis was corroborated by histological sections that showed early collapsing inside the defect when using the polysaccharide membrane without HA and the Bio-Gide® membrane, whereas collapsing was not observed with Mb + HA. Therefore, the addition of mineral particles enhances space-maintaining properties, which is critical to guarantee the blood clot's stability and then to support bone formation accordingly.

The organization and spatial distribution of collagen fibers contained in the newly formed bone was also assessed, since they play a critical role in guiding its mechanical and biological properties [51]. Picrosirius red staining was thus performed to assess fiber orientation. This method, relying on the birefringence of collagen fibers, is used in combination with polarized light microscopy to specifically highlight collagen networks [52,53]. Our results showed that covering the defect with Mb + HA improved bone quality regarding collagen fibers orientation and organization compared to the membrane without HA. This finding suggested the potential use of this membrane for GBR procedures to maintain bone substitutes inside the defect area (e.g., femoral segmental defect).

Our analysis of late bone regeneration did not evidence differences between conditions. This could be explained by the defect model in this study, a non-critical size defect, thereby showing bone healing in all the conditions after one month. In addition, longer timepoints should be considered (e.g., 8 weeks) to investigate bone healing quality and enable different healing processes between conditions. However, this mono-cortical femoral bone defect model was chosen mainly for two reasons. First, non-critical size femoral bone defects are widely performed in rodents because it is known to be an easily replicable and reliable model to perform, which is also easier to quantify [31,54,55]. Furthermore, the healing process has similarities to that of the jaw bones, which occurs through intramembranous ossification [54]. The present study mainly aimed to assess two pullulan/dextran-based membranes with or without HA to select the one with the best potential for GBR. From all the observed data obtained here, Mb + HA seemed to be the best candidate as it offered a better space-making property to enable bone growth and was easier to handle for the surgeon. The selected Mb + HA will be further assessed in a larger maxillary pre-clinical model in association with bone graft substitutes [56,57]. To further support the relevance of our material, it should be tested in a critical size defect in rats (e.g., mandibular defect). Additionally, to promote its translation into clinics, a larger animal model should be considered (e.g., sinus floor augmentation in sheep) [21,22]. This model will enable the assessment of the potential of the membrane in a more relevant model that (i) better mimics the anatomical and compositional characteristics of human bones and that (ii) it is easier to perform in a clinical setting due to its manageability.

Further investigations on the polysaccharide membranes morphology need to be studied to better understand their GBR properties. Indeed, the Bio-Gide® membrane is composed of two distinct sides: (i) a rough-like side with an open-pore layer to face the

defect and support osteogenic cell proliferation and vascularization, and (ii) a smooth-like side with a compact collagen layer to limit soft tissue invasion [58]. For the polysaccharide membranes, the influence of porosity will be a key component to ensure occlusive effect at the defect site since the membrane should limit cell invasion without compromising the oxygen and nutrient exchanges [1,33,59].

5. Conclusions

This study is the first to develop and evaluate pullulan/dextran-based membranes, associated or not with HA, for GBR procedures. Both membranes fulfilled several fundamental criteria for effective barrier membrane. They were not only non-cytotoxic in vitro but also biocompatible in vivo. The incorporation of HA into the membrane formulation improved mechanical handling and space-maintaining ability to guide bone formation. Mb + HA also enhanced early bone regeneration and favored the formation of a well-organized and mature bone. This membrane achieved the most promising results for GBR procedures. Future investigations will question its translation into clinical practice. To do so, it will be implanted in a larger maxillofacial pre-clinical model in association with bone graft substitutes to further assess its efficacy and potential for enhancing GBR procedures.

Author Contributions: Conceptualization, N.A.O., M.F., J.-C.F., J.A., and D.L.; methodology, N.A.O., J.R., P.G., R.S., L.B., C.B., S.R., M.D., O.C., S.C., and P.A.; validation, M.F., J.-C.F., J.A., and D.L.; formal analysis, N.A.O., J.R., and S.R.; writing—original draft preparation, N.A.O.; writing—review and editing, M.F., J.A., and D.L.; supervision, M.F. and J.-C.F.; funding acquisition, J.-C.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by ANR-20-CE18-0034 grant GlycoMb. Partial Ph.D. funding for N.A.O. was provided by SILTISS company.

Institutional Review Board Statement: All the procedures for rat handling were based on the principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and approved by the Animal Care and Experiment Committee of University of Bordeaux, Bordeaux, France. These experiments were performed in an accredited animal facility following European recommendation for laboratory animal care (directive 86/609 CEE of 24/11/86) (authorization A33-063-917). Protocols code: APAFIS #2016030408537165 v4 and APAFIS #32504-2021072111152646 v4.

Informed Consent Statement: Not applicable for this study.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors acknowledged Laëticia Medan as manager of the animal facility, Kilian Henry, and Lofti Slimani (Plateforme d'Imagerie du Vivant, Université Paris Cité, Montrouge) for micro-CT acquisition. The authors also thank Annina Luck, Emmanuel Ormea, and Nicolas Coutant for technical support on VGSTUDIO MAX software (version 2022.3). The acquisition of histological images with the slide scanner (Nano-zoomer) was performed in the Bordeaux Imaging Center (a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University) with the help of Sébastien Marais.

Conflicts of Interest: The authors declare that this study received funding from SILTISS. The funder had the following involvement in the study: partial funding of Ph.D. of N.A.O. D.L. has shares in SILTISS, which holds four patents on these scaffolds for tissue engineering.

References

1. Yang, Z.; Wu, C.; Shi, H.; Luo, X.; Sun, H.; Wang, Q.; Zhang, D. Advances in Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration Techniques. *Front Bioeng Biotechnol* **2022**, *10*, 921576, doi:10.3389/fbioe.2022.921576.
2. Omar, O.; Elgali, I.; Dahlin, C.; Thomsen, P. Barrier Membranes: More than the Barrier Effect? *J Clin Periodontol* **2019**, *46 Suppl 21*, 103–123, doi:10.1111/jcpe.13068.
3. Zhao, R.; Yang, R.; Cooper, P.R.; Khurshid, Z.; Shavandi, A.; Ratnayake, J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules* **2021**, *26*, 3007, doi:10.3390/molecules26103007.

4. Aprile, P.; Letourneur, D.; Simon-Yarza, T. Membranes for Guided Bone Regeneration: A Road from Bench to Bedside. *Adv Healthc Mater* **2020**, *9*, e2000707, doi:10.1002/adhm.202000707.
5. Bottino, M.C.; Thomas, V.; Schmidt, G.; Vohra, Y.K.; Chu, T.-M.G.; Kowolik, M.J.; Janowski, G.M. Recent Advances in the Development of GTR/GBR Membranes for Periodontal Regeneration--a Materials Perspective. *Dent Mater* **2012**, *28*, 703–721, doi:10.1016/j.dental.2012.04.022.
6. Lee, S.-W.; Kim, S.-G. Membranes for the Guided Bone Regeneration. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery* **2014**, *36*, 239–246, doi:10.14402/jkamprs.2014.36.6.239.
7. Solomon, S.-M.; Sufaru, I.-G.; Teslaru, S.; Ghiciuc, C.M.; Stafie, C.S. Finding the Perfect Membrane: Current Knowledge on Barrier Membranes in Regenerative Procedures: A Descriptive Review. *Applied Sciences* **2022**, *12*, 1042, doi:10.3390/app12031042.
8. Retzepi, M.; Donos, N. Guided Bone Regeneration: Biological Principle and Therapeutic Applications. *Clin Oral Implants Res* **2010**, *21*, 567–576, doi:10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x.
9. Pellegrini, G.; Pagni, G.; Rasperini, G. Surgical Approaches Based on Biological Objectives: GTR versus GBR Techniques. *International Journal of Dentistry* **2013**, *2013*, e521547, doi:10.1155/2013/521547.
10. Sheikh, Z.; Hamdan, N.; Ikeda, Y.; Grynypas, M.; Ganss, B.; Glogauer, M. Natural Graft Tissues and Synthetic Biomaterials for Periodontal and Alveolar Bone Reconstructive Applications: A Review. *Biomater Res* **2017**, *21*, 9, doi:10.1186/s40824-017-0095-5.
11. Guillén-Carvajal, K.; Valdez-Salas, B.; Beltrán-Partida, E.; Salomón-Carlos, J.; Cheng, N. Chitosan, Gelatin, and Collagen Hydrogels for Bone Regeneration. *Polymers (Basel)* **2023**, *15*, 2762, doi:10.3390/polym15132762.
12. Zheng, M.; Wang, X.; Chen, Y.; Yue, O.; Bai, Z.; Cui, B.; Jiang, H.; Liu, X. A Review of Recent Progress on Collagen-Based Biomaterials. *Advanced Healthcare Materials* **2023**, *12*, 2202042, doi:10.1002/adhm.202202042.
13. Hassanein, M.; Anderson, J.A. Refusal of Animal-Derived Medical Products in a Paediatric Setting: Ethical Issues. *Paediatr Child Health* **2020**, *26*, 99–102, doi:10.1093/pch/pxz171.
14. Moscovici, M. Present and Future Medical Applications of Microbial Exopolysaccharides. *Front Microbiol* **2015**, *6*, 1012, doi:10.3389/fmicb.2015.01012.
15. Carvalho, L.T.; Vieira, T.A.; Zhao, Y.; Celli, A.; Medeiros, S.F.; Lacerda, T.M. Recent Advances in the Production of Biomedical Systems Based on Polyhydroxyalkanoates and Exopolysaccharides. *Int J Biol Macromol* **2021**, *183*, 1514–1539, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.025.
16. Hussain, A.; Zia, K.M.; Tabasum, S.; Noreen, A.; Ali, M.; Iqbal, R.; Zuber, M. Blends and Composites of Exopolysaccharides; Properties and Applications: A Review. *Int J Biol Macromol* **2017**, *94*, 10–27, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104.
17. Singh, R.S.; Kaur, N.; Singh, D.; Purewal, S.S.; Kennedy, J.F. Pullulan in Pharmaceutical and Cosmeceutical Formulations: A Review. *Int J Biol Macromol* **2023**, *231*, 123353, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123353.
18. Hayashi, C.; Hasegawa, U.; Saita, Y.; Hemmi, H.; Hayata, T.; Nakashima, K.; Ezura, Y.; Amagasa, T.; Akiyoshi, K.; Noda, M. Osteoblastic Bone Formation Is Induced by Using Nanogel-Crosslinking Hydrogel as Novel Scaffold for Bone Growth Factor. *J Cell Physiol* **2009**, *220*, 1–7, doi:10.1002/jcp.21760.
19. Ahmed Omar, N.; Amédée, J.; Letourneur, D.; Fricain, J.-C.; Fenelon, M. Recent Advances of Pullulan and/or Dextran-Based Materials for Bone Tissue Engineering Strategies in Preclinical Studies: A Systematic Review. *Front Bioeng Biotechnol* **2022**, *10*, 889481, doi:10.3389/fbioe.2022.889481.
20. Schlaubitz, S.; Derkaoui, S.M.; Marosa, L.; Miraux, S.; Renard, M.; Catros, S.; Le Visage, C.; Letourneur, D.; Amédée, J.; Fricain, J.-C. Pullulan/Dextran/nHA Macroporous Composite Beads for Bone Repair in a Femoral Condyle Defect in Rats. *PLoS One* **2014**, *9*, e110251, doi:10.1371/journal.pone.0110251.

21. Fricain, J.C.; Aid, R.; Lanouar, S.; Maurel, D.B.; Le Nihouannen, D.; Delmond, S.; Letourneur, D.; Amedee Vilamitjana, J.; Catros, S. In-Vitro and in-Vivo Design and Validation of an Injectable Polysaccharide-Hydroxyapatite Composite Material for Sinus Floor Augmentation. *Dental Materials* **2018**, *34*, 1024–1035, doi:10.1016/j.dental.2018.03.021.
22. Maurel, D.B.; Fénelon, M.; Aid-Launais, R.; Bidault, L.; Le Nir, A.; Renard, M.; Fricain, J.-C.; Letourneur, D.; Amédée, J.; Catros, S. Bone Regeneration in Both Small and Large Preclinical Bone Defect Models Using an Injectable Polymer-Based Substitute Containing Hydroxyapatite and Reconstituted with Saline or Autologous Blood. *J Biomed Mater Res A* **2021**, doi:10.1002/jbm.a.37176.
23. Fricain, J.C.; Schlaubitz, S.; Le Visage, C.; Arnault, I.; Derkaoui, S.M.; Siadous, R.; Catros, S.; Lalande, C.; Bareille, R.; Renard, M.; et al. A Nano-Hydroxyapatite–Pullulan/Dextran Polysaccharide Composite Macroporous Material for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2947–2959, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.049.
24. Ribot, E.J.; Tournier, C.; Aid-Launais, R.; Koonjoo, N.; Oliveira, H.; Trotier, A.J.; Rey, S.; Wecker, D.; Letourneur, D.; Amedee Vilamitjana, J.; et al. 3D Anatomical and Perfusion MRI for Longitudinal Evaluation of Biomaterials for Bone Regeneration of Femoral Bone Defect in Rats. *Sci Rep* **2017**, *7*, 6100, doi:10.1038/s41598-017-06258-0.
25. Miyahara, T.; Nyan, M.; Shimoda, A.; Yamamoto, Y.; Kuroda, S.; Shiota, M.; Akiyoshi, K.; Kasugai, S. Exploitation of a Novel Polysaccharide Nanogel Cross-Linking Membrane for Guided Bone Regeneration (GBR). *J Tissue Eng Regen Med* **2012**, *6*, 666–672, doi:10.1002/term.475.
26. ISO 10993-5:2009 Available online: <https://www.iso.org/fr/standard/36406.html> (accessed on 22 October 2023).
27. Vilamitjana-Amedee, J.; Bareille, R.; Rouais, F.; Caplan, A.I.; Harmand, M.F. Human Bone Marrow Stromal Cells Express an Osteoblastic Phenotype in Culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **1993**, *29A*, 699–707, doi:10.1007/BF02631426.
28. ISO 10993-12:2021 Available online: <https://www.iso.org/fr/standard/75769.html> (accessed on 22 October 2023).
29. ISO 10993-6:2016 Available online: <https://www.iso.org/fr/standard/61089.html> (accessed on 22 October 2023).
30. Fenelon, M.; B Maurel, D.; Siadous, R.; Gremare, A.; Delmond, S.; Durand, M.; Brun, S.; Catros, S.; Gindraux, F.; L'Heureux, N.; et al. Comparison of the Impact of Preservation Methods on Amniotic Membrane Properties for Tissue Engineering Applications. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *104*, 109903, doi:10.1016/j.msec.2019.109903.
31. Fenelon, M.; Etchebarne, M.; Siadous, R.; Grémare, A.; Durand, M.; Sentilhes, L.; Torres, Y.; Catros, S.; Gindraux, F.; L'Heureux, N.; et al. Assessment of Fresh and Preserved Amniotic Membrane for Guided Bone Regeneration in Mice. *J Biomed Mater Res A* **2020**, *108*, 2044–2056, doi:10.1002/jbm.a.36964.
32. Fonck, E.; Feigl, G.G.; Fasel, J.; Sage, D.; Unser, M.; Rüfenacht, D.A.; Stergiopoulos, N. Effect of Aging on Elastin Functionality in Human Cerebral Arteries. *Stroke* **2009**, *40*, 2552–2556, doi:10.1161/STROKEAHA.108.528091.
33. Autissier, A.; Le Visage, C.; Pouzet, C.; Chaubet, F.; Letourneur, D. Fabrication of Porous Polysaccharide-Based Scaffolds Using a Combined Freeze-Drying/Cross-Linking Process. *Acta Biomater* **2010**, *6*, 3640–3648, doi:10.1016/j.actbio.2010.03.004.
34. Grenier, J.; Duval, H.; Barou, F.; Lv, P.; David, B.; Letourneur, D. Mechanisms of Pore Formation in Hydrogel Scaffolds Textured by Freeze-Drying. *Acta Biomater* **2019**, *94*, 195–203, doi:10.1016/j.actbio.2019.05.070.
35. Grenier, J.; Duval, H.; Lv, P.; Barou, F.; Le Guilcher, C.; Aid, R.; David, B.; Letourneur, D. Interplay between Crosslinking and Ice Nucleation Controls the Porous Structure of Freeze-Dried Hydrogel Scaffolds. *Biomater Adv* **2022**, *139*, 212973, doi:10.1016/j.bioadv.2022.212973.

36. Grenier, J.; David, B.; Journé, C.; Cicha, I.; Letourneur, D.; Duval, H. Perfusion of MC3T3E1 Preosteoblast Spheroids within Polysaccharide-Based Hydrogel Scaffolds: An Experimental and Numerical Study at the Bioreactor Scale. *Bioengineering* **2023**, *10*, 849, doi:10.3390/bioengineering10070849.
37. Labour, M.-N.; Le Guilcher, C.; Aid-Launais, R.; El Samad, N.; Lanouar, S.; Simon-Yarza, T.; Letourneur, D. Development of 3D Hepatic Constructs Within Polysaccharide-Based Scaffolds with Tunable Properties. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 3644, doi:10.3390/ijms21103644.
38. Gerschenfeld, G.; Aid, R.; Simon-Yarza, T.; Lanouar, S.; Charnay, P.; Letourneur, D.; Topilko, P. Tuning Physicochemical Properties of a Macroporous Polysaccharide-Based Scaffold for 3D Neuronal Culture. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 12726, doi:10.3390/ijms222312726.
39. Le Guilcher, C.; Merlen, G.; Dellaquila, A.; Labour, M.-N.; Aid, R.; Tordjmann, T.; Letourneur, D.; Simon-Yarza, T. Engineered Human Liver Based on Pullulan-Dextran Hydrogel Promotes Mice Survival after Liver Failure. *Mater Today Bio* **2023**, *19*, 100554, doi:10.1016/j.mtbio.2023.100554.
40. Wang, J.; Wang, L.; Zhou, Z.; Lai, H.; Xu, P.; Liao, L.; Wei, J. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers (Basel)* **2016**, *8*, 115, doi:10.3390/polym8040115.
41. Wang, H.-L.; Boyapati, L. "PASS" Principles for Predictable Bone Regeneration. *Implant Dent* **2006**, *15*, 8–17, doi:10.1097/01.id.0000204762.39826.0f.
42. Filippi, M.; Born, G.; Chaaban, M.; Scherberich, A. Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, doi:10.3389/fbioe.2020.00474.
43. Radenković, M.; Alkildani, S.; Stoewe, I.; Bielenstein, J.; Sundag, B.; Bellmann, O.; Jung, O.; Najman, S.; Stojanović, S.; Barbeck, M. Comparative In Vivo Analysis of the Integration Behavior and Immune Response of Collagen-Based Dental Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes (Basel)* **2021**, *11*, 712, doi:10.3390/membranes11090712.
44. Abed, A.; Assoul, N.; Ba, M.; Derkaoui, S.M.; Portes, P.; Louedec, L.; Flaud, P.; Bataille, I.; Letourneur, D.; Meddahi-Pellé, A. Influence of Polysaccharide Composition on the Biocompatibility of Pullulan/Dextran-Based Hydrogels. *J Biomed Mater Res A* **2011**, *96*, 535–542, doi:10.1002/jbm.a.33007.
45. Li, J.J.; Zreiqat, H. *Tissue Response to Biomaterials*; Elsevier, 2019; ISBN 978-0-12-804829-0.
46. Neto, A.M.D.; Sartoretto, S.C.; Duarte, I.M.; Resende, R.F. de B.; Neves Novellino Alves, A.T.; Mourão, C.F. de A.B.; Calasans-Maia, J.; Montemezzi, P.; Tristão, G.C.; Calasans-Maia, M.D. In Vivo Comparative Evaluation of Biocompatibility and Biodegradation of Bovine and Porcine Collagen Membranes. *Membranes (Basel)* **2020**, *10*, 423, doi:10.3390/membranes10120423.
47. Lindner, C.; Alkildani, S.; Stojanovic, S.; Najman, S.; Jung, O.; Barbeck, M. In Vivo Biocompatibility Analysis of a Novel Barrier Membrane Based on Bovine Dermis-Derived Collagen for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes* **2022**, *12*, doi:10.3390/membranes12040378.
48. Zhu, M.; Duan, B.; Hou, K.; Mao, L.; Wang, X. A Comparative in Vitro and in Vivo Study of Porcine- and Bovine-Derived Non-Cross-Linked Collagen Membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2023**, *111*, 568–578, doi:10.1002/jbm.b.35174.
49. Piattelli, A.; Franco, M.; Ferronato, G.; Santello, M.T.; Martinetti, R.; Scarano, A. Resorption of Composite Polymer–Hydroxyapatite Membranes: A Time-Course Study in Rabbit. *Biomaterials* **1997**, *18*, 629–633, doi:10.1016/S0142-9612(96)00163-9.
50. Huang, D.; Niu, L.; Li, J.; Du, J.; Wei, Y.; Hu, Y.; Lian, X.; Chen, W.; Wang, K. Reinforced Chitosan Membranes by Microspheres for Guided Bone Regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater* **2018**, *81*, 195–201, doi:10.1016/j.jmbbm.2018.03.006.

51. Garnero, P. The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcif Tissue Int* **2015**, *97*, 229–240, doi:10.1007/s00223-015-9996-2.
52. Liu, J.; Xu, M.; Wu, J.; Zhang, H.; Yang, L.; Lun, D.; Hu, Y.; Liu, B. Picrosirius-Polarization Method for Collagen Fiber Detection in Tendons: A Mini-Review. *Orthopaedic Surgery* **2021**, *13*, 701–707, doi:10.1111/os.12627.
53. Rittié, L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. In *Fibrosis: Methods and Protocols*; Rittié, L., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, 2017; pp. 395–407 ISBN 978-1-4939-7113-8.
54. Monfoulet, L.; Malaval, L.; Aubin, J.E.; Rittling, S.R.; Gadeau, A.P.; Fricain, J.-C.; Chassande, O. Bone Sialoprotein, but Not Osteopontin, Deficiency Impairs the Mineralization of Regenerating Bone during Cortical Defect Healing. *Bone* **2010**, *46*, 447–452, doi:10.1016/j.bone.2009.09.007.
55. Hulsart-Billström, G.; Bergman, K.; Andersson, B.; Hilborn, J.; Larsson, S.; Jonsson, K.B. A Uni-Cortical Femoral Defect Model in the Rat: Evaluation Using Injectable Hyaluronan Hydrogel as a Carrier for Bone Morphogenetic Protein-2. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2015**, *9*, 799–807, doi:10.1002/term.1655.
56. Elgali, I.; Omar, O.; Dahlin, C.; Thomsen, P. Guided Bone Regeneration: Materials and Biological Mechanisms Revisited. *Eur J Oral Sci* **2017**, *125*, 315–337, doi:10.1111/eos.12364.
57. Kormas, I.; Pedercini, A.; Alassy, H.; Wolff, L.F. The Use of Biocompatible Membranes in Oral Surgery: The Past, Present & Future Directions. A Narrative Review. *Membranes (Basel)* **2022**, *12*, 841, doi:10.3390/membranes12090841.
58. Schwarz, F.; Rothamel, D.; Hertel, M.; Sager, M.; Becker, J. Angiogenesis Pattern of Native and Cross-Linked Collagen Membranes: An Immunohistochemical Study in the Rat. *Clin Oral Implants Res* **2006**, *17*, 403–409, doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01225.x.
59. Sanz, M.; Dahlin, C.; Apatzidou, D.; Artzi, Z.; Bozic, D.; Calciolari, E.; De Bruyn, H.; Dommisch, H.; Donos, N.; Eickholz, P.; et al. Biomaterials and Regenerative Technologies Used in Bone Regeneration in the Craniomaxillofacial Region: Consensus Report of Group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol* **2019**, *46 Suppl 21*, 82–91, doi:10.1111/jcpe.13123.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.3. Conclusion

Dans ce premier article, les membranes produites à partir des deux polysaccharides, le pullulane et le dextrane, combinés ou non avec de l'hydroxyapatite étaient cytocompatibles *in vitro* et biocompatibles *in vivo*. Leur structure poreuse avec une différence de taille de pores entre les faces pourrait être un atout afin d'assurer leur occlusivité. En effet, la face dite « lisse » présente une taille de pores comprise entre 10 et 20 μm . Elle empêcherait ainsi l'infiltration cellulaire et/ou bactérienne tout en laissant pénétrer les nutriments essentiels à la formation osseuse. Dans le modèle ectopique, ces deux formulations n'ont pas présenté d'infiltration cellulaire, contrairement à la membrane collagénique, et ce jusqu'à 16 semaines après implantation, confortant ainsi l'hypothèse de leur rôle barrière.

La comparaison de ces deux formulations dans un défaut non critique chez le rat a permis de sélectionner la membrane contenant de l'HA en vue de son utilisation pour la ROG. Lorsque la membrane est renforcée avec des particules d'HA, elle offre une meilleure stabilité du caillot sanguin, même à des temps précoces (2 semaines après l'opération). En revanche, sans ces particules d'HA, la membrane a tendance à s'affaisser dans le défaut osseux. En pratique clinique, les membranes d'origine naturelle sont souvent associées à un substitut osseux pour éviter cet affaissement dû à une faible résistance mécanique. Nous avons évalué localement les propriétés élastiques de ces matériaux en utilisant la nano-indentation (**Figure 40**). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux formulations de membranes, ni même entre les différentes faces pour une même membrane. Cependant, les images obtenues par microscanner ont révélé une minéralisation progressive de la membrane renforcée avec de l'HA. L'évaluation des propriétés élastiques de cette membrane après son implantation pourrait confirmer la corrélation avec le maintien du défaut osseux en place.

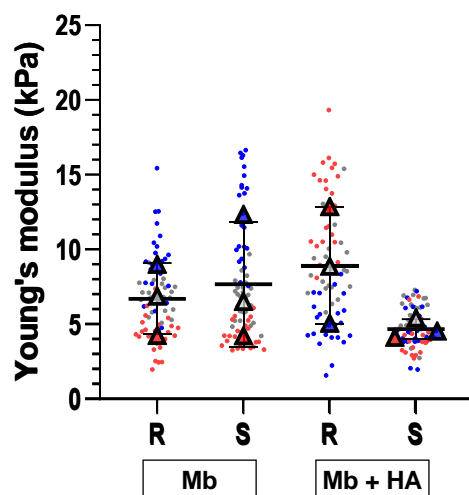


Figure 40 : Evaluation des propriétés mécaniques (modules d'Young) des différentes formulations par nano-indentation ; chaque couleur représente un échantillon (N=3 par échantillon), chaque point correspond à une mesure (n=25 par échantillon) et le triangle correspondant à la moyenne de ces mesures.

La membrane renforcée avec de l'HA (Mb + HA) a donc été sélectionnée pour la suite de ces travaux afin de l'évaluer dans un modèle plus proche d'une application clinique en chirurgie orale.

5 Mise au point d'un modèle pré-clinique de défaut maxillaire chez le rat pour tester l'efficacité sur la régénération osseuse de la membrane en pullulane/dextrane/HA

5.1 Introduction

Les modèles pré-cliniques usuellement utilisés pour l'évaluation de dispositifs implantables en chirurgie orale et maxillo-faciale sont souvent réalisés chez le gros animal (brebis, porc, chien). La pertinence du site anatomique, plus proche de la physiologie osseuse humaine, en font des modèles de choix mais sont souvent onéreux et limitent ainsi l'étude de ces biomatériaux.

Nous proposons, dans cette seconde partie, la mise au point d'un nouveau modèle pour la chirurgie orale réalisée chez le rongeur. Dans notre revue de la littérature, nous avons mis en évidence que les modèles de chirurgie crânio-faciale les plus utilisés chez le rongeur étaient des défauts de calvaria. L'implantation au niveau du crâne ne permet pas de mettre en évidence l'impact des contraintes physiques exercées sur ces biomatériaux. Il existe d'autres modèles pré-cliniques prenant en considération ces contraintes mécaniques comme par exemple dans un défaut réalisé au niveau de l'angle mandibulaire. Toutefois, ces contraintes ne concernent pas la portion dentée de la mandibule ce qui peut limiter leur transposition en pratique clinique. De plus, ces modèles sont difficiles à mettre au point car des dommages au niveau du canal parotidien ou du nerf facial peuvent altérer la mastication de l'animal.

Les objectifs de ce projet d'article étaient : i) de développer un nouveau défaut critique au niveau de l'os maxillaire chez le rat et ii) de valider son utilisation pour tester des matériaux en chirurgie orale en implantant la membrane en pullulane/dextrane/HA précédemment sélectionnée.

Dans un premier temps, trois tailles différentes de défaut ont été réalisées (2.8, 3.3 et 4.5 mm) dans le maxillaire de rat afin d'évaluer sa taille critique. Un suivi longitudinal de la régénération osseuse a été effectué sur 12 semaines post-chirurgie à la plateforme de microscanner de l'Institut des maladies du rythme cardiaque de Pessac (IHU Liryc). Une étude histologique des maxillaires 12 semaines après implantation a été réalisée pour observer la structure de l'os néoformé.

Dans un second temps, un substitut osseux (GlycoBone®) recouvert par une membrane collagénique (Bio-Gide®) ou une membrane polysaccharique (Mb + HA, la membrane précédemment sélectionnée dans l'article n°1) ont été implantés dans ce défaut afin d'imiter les pratiques cliniques pour évaluer la pertinence de ce nouveau défaut osseux et l'influence de la membrane combinée au GlycoBone® sur la régénération osseuse.

Les matériaux utilisés pour cette étude ont été fournis par l'entreprise SILTISS (GlycoBone® et Mb + HA) ou acheté chez Geistlich (Bio-Gide®).

5.2 Article n°3

1 **A standardized rat alveolar bone defect model to study bone regenerative approaches in**
2 **oral and maxillofacial surgery**

3 Naïma Ahmed Omar¹, Jéssica Roque¹, Céline Bergeaut², Laurent Bidault², Joëlle Amédée¹,
4 Didier Letourneur³, Jean-Christophe Fricain^{1,4}, Mathilde Fenelon^{1,4}

5

6 ¹ Université de Bordeaux, INSERM 1026, BioTis, F-33076 Bordeaux, France,

7 ² Siltiss, SA, Zac de la Nau, 19240 Saint-Viance, France

8 ³ Université Paris Cité, Université Sorbonne Paris Nord, INSERM 1148, LVTS, Hôpital X
9 Bichat, F-75018 Paris, France

10 ⁴ CHU de Bordeaux, Service de Chirurgie Orale, F-33076 Bordeaux, France

11 **Abstract**

12 Innovative biomaterials are increasingly being investigated for guided bone regeneration
13 (GBR) in oral and maxillofacial surgery. This study aimed to propose a reproducible critical
14 maxillary bone defect model in rats that could be relevant to evaluate new materials for GBR.
15 We first compared three defect sizes (2.8, 3.3, and 4.5 mm in diameter) in rat maxillary, and
16 assessed until 12 weeks post-surgery, bone regeneration using longitudinal micro-computed
17 tomography and histological analysis. The defect was subsequently filled by an
18 osteoconductive bone substitute (GlycoBone®), then covered either by a new natural
19 polysaccharide membrane supplemented with hydroxyapatite, or by a commercial collagen
20 membrane (Bio-Gide®). Results showed little spontaneous tissue regeneration for empty
21 defects (bone volume fractions (BVF) below 40 % after 12 weeks). The smallest size defect
22 (2.8 mm) was the most reproducible and was thus selected for testing GBR membranes. Defects
23 filled with GlycoBone® and covered with membranes displayed for both materials accelerated
24 and substantial bone regeneration (with BVF that reached 80 % after 12 weeks). Histological
25 sections showed immature bone formation for the empty defects, whereas the defects filled with
26 the GBR membranes highlighted a lamellar structured bone. The polysaccharide membrane was
27 as effective as the commercial collagen membrane to guide bone tissue regeneration. This study
28 provides a step-by-step protocol of a new critical rat maxillary bone defect model. In line with
29 ethical and financial considerations, this rodent model should be considered as a preliminary
30 level before performing larger animal experiments.

31 **Key-words:** preclinical model; micro-computed tomography; guided bone regeneration;
32 membrane; bone graft substitute

33

34

42 **Introduction**

43 Oral and maxillofacial bone defects can arise from various causes such as tumor resection,
44 severe trauma, congenital malformation, bone resorption due to periodontal disease, or tooth
45 loss [1–4]. The management of such defects is a public health issue, as they can lead to severe
46 oral dysfunction and facial deformities resulting in impaired quality of life. It requires bone
47 reconstruction procedures to allow subsequent rehabilitation by placement of dental implants
48 [5]. Guided bone regeneration (GBR) is one of the most commonly used reconstruction
49 techniques for jaw bone augmentation [6]. However, these surgical procedures still remain a
50 clinical challenge for oral and maxillofacial surgeons mainly due to the limitations of
51 autologous bone grafts (*i.e.*, the limited availability and additional donor site morbidity) [7].
52 Bone tissue engineering (BTE) strategies have thus gained increasing interest for the
53 development of innovative biomaterials to regenerate alveolar bone [8,9]. These biomaterials
54 must fulfill specific requirements including biocompatibility, biodegradability, osteoinductive
55 or osteoconductive properties, mechanical strength, and ease of handling suitability [10].

56 Preclinical assessment of these new materials using clinically relevant animal models is
57 essential for translational research [11]. Although large animal models are often considered for
58 their close resemblance to human physiology (similarity in terms of size, load-bearing capacity,
59 and masticatory characteristics) [12–16], they are expensive and it is important to emphasize
60 that their use should be carefully limited for ethical concerns [17–19]. It is thus necessary to
61 prioritize small animal models to provide preliminary screening and assessment of candidate
62 materials before performing larger animal models.

63 For this purpose, it is crucial to select relevant small animal models depending on the targeted
64 applications. In oral and maxillofacial surgery, rodents mainly offer two well-established
65 models for investigating bone regeneration: calvarial and mandibular bone defects [20,21].
66 Calvarial defects are the most commonly employed models due to their reproducibility and the

67 simplicity of subsequent radiological and histological analyses [22,23]. Unfortunately, these
68 defects are not suitable for investigating load-bearing capacity. To address this limitation, rat
69 mandibular bone defects have been performed to test biomaterials for oral applications [24–
70 27]. However, surgical interventions in this area present major difficulties such as the risk of
71 masseter injury or damage to crucial anatomical structures such as the parotid duct, the facial
72 nerve and artery or dental roots [25,28]. Liu *et al.* also emphasized that these studies usually
73 lack standard and reproducible criteria such as age and gender of the animals, defect location
74 and size, as well as operative procedures and observation time [25]. Additionally, these defects
75 are all performed in the mandibular ramus instead of alveolar bone which is usually the targeted
76 location for bone regeneration in clinical practice. Therefore, a maxillary alveolar bone defect
77 model could be considered as a suitable alternative for the two models mentioned above. To
78 our knowledge, there is no consensus concerning a well-established and characterized maxillary
79 bone defect model of critical size in rodents to assess biomaterials for oral and maxillofacial
80 surgery [25,29–34].

81 Therefore, the aim of this study was to develop a critical and reliably reproducible bone defect
82 model in the rat maxilla that will be useful to further assess biomaterials in the field of oral and
83 maxillofacial surgery. For this purpose, three different sizes of maxillary bone defects were first
84 assessed (2.8, 3.3 and 4.5 mm). Then, a bone substitute (GlycoBone®) already identified as
85 osteoconductive material [16,35–37], and covered by either a new GBR membrane under
86 development based on biodegradable polysaccharides [38], or a commercial collagen
87 membrane (Bio-Gide®, Geistlich, Switzerland), were subsequently implanted in the selected
88 model to validate its suitability for testing materials for oral and maxillofacial applications.

89

90 **2. Material and Methods**

91 2.1. Animal experiments

92 Two rat experimental procedures were performed in this study. The first one aimed to develop
93 a critical size defect model in the maxilla by assessing three different bone size defects. The
94 second experimentation focused on the validation of this model by testing BTE materials. Both
95 animal procedures were performed following the principles of Laboratory Animal Care
96 formulated by the National Society for Medical Research and approved by the Animal Care and
97 Experiment Committee of the University of Bordeaux, Bordeaux, France. Experiments were
98 conducted in accredited animal facilities following European recommendations for laboratory
99 animal care (directive 86/609 CEE of 24/11/86). Prior to the surgeries, animals were
100 quarantined and housed in cages for acclimatization during 7 days. All surgeries were
101 performed by one surgeon in aseptic conditions with sterile surgical materials.

102 2.2. Development of a new maxillary bone defect model

103 *Surgical procedure*

104 Twelve adult male Sprague-Dawley rats (11-week-old, 350-400 g body weight) were used for
105 the first study (approval by the French Ethics Committee under APAFIS n°
106 202002061614957v4). To limit pain, buprenorphine (0.05 mg/kg) was injected
107 intraperitoneally before the surgery. Animals were anesthetized with a mixture of ketamine (50
108 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) diluted in physiological serum (NaCl 0.9 % (m/v))
109 administrated by intraperitoneal injection. A 1 cm ridge incision was performed and a full-
110 thickness flap was subsequently raised to expose the maxillary bone. Animals were divided into
111 three groups according to the defect size: i) 2.8 mm, ii) 3.3 mm, and iii) 4.5 mm diameter ($n =$
112 8 per condition). Under irrigation, a defect was then created using a different trephine bur
113 (Helmut Zepf, Germany) for each of the three diameters. The defect was performed on the
114 buccal bone in the middle of the maxilla between the palatal suture and the beginning of the

115 crown incisor (Figure 1). Hemostasis was performed by local compression. Defects were
116 created on each maxilla, resulting in two defects per animal. Mucosa flaps were then sutured
117 using a 6/0 Prolene (Ethicon, France) suture thread. To facilitate animal recovery, softened food
118 was placed inside the cages and intraperitoneal injections of buprenorphine (0.05 mg/kg) were
119 administered daily for 48 h. After 12 weeks, animals were sacrificed ($n = 8$ maxillae per
120 condition) by carbon dioxide under general anesthesia (isoflurane 2 % (v/v)). Maxillae were
121 collected and fixed overnight in PFA 4 % (Antigenfix, Diapath, France) at 4 °C.

122 2.3. Assessment of the proposed maxillary bone defect model for material testing

123 2.3.1. Material preparation

124 Three materials were used for the second animal experiment: a bone substitute (GlycoBone®),
125 a polysaccharide-based membrane containing hydroxyapatite particles, and a commercial and
126 widely-used collagen membrane (Bio-Gide®, Geistlich, Switzerland).

127 2.3.1.1. Bone substitute preparation

128 The bone graft substitute (GlycoBone®) was composed of a polysaccharidic blend
129 (pullulan/dextran with a ratio of 75:25) combined with hydroxyapatite. Previous studies already
130 investigated its osteoconductive properties [16,35–37,39,40]. Microbeads of gamma-irradiated
131 GlycoBone® were rehydrated [36] with a sterile NaCl solution (0.9 % (m/v)) before their
132 implantation in the maxillae.

133 2.3.1.2. Polysaccharide-based membrane preparation

134 The pullulan/dextran-based membrane containing hydroxyapatite (GlycoMembrane) was
135 prepared according to a previously reported procedure [38]. Membrane was cut into 5 x 5 mm
136 pieces to cover the bone defect and was stored at room temperature before implantation.

137 2.3.1.3. Collagen membrane preparation

138 The resorbable collagen membrane (Bio-Gide®) was cut into 5 × 5 mm pieces and stored at
139 room temperature before implantation.

140 2.3.2. Surgical procedure

141 The second experimentation was also performed on twelve adult rats, 11 weeks old (agreement
142 APAFIS n° 35311-2022020911368338v2) and aimed to validate the above model to implant
143 and assess new BTE materials for bone regeneration. Therefore, the same procedure was
144 performed. Briefly, after anesthesia, a 2.8 mm in diameter defect was performed under
145 irrigation using a trephine bur (Helmut Zepf, Germany) on each rat maxilla. To mimic clinical
146 GBR procedures, two different conditions were allocated to each animal: i) defect filled with
147 the bone graft substitute (GlycoBone®) and subsequently covered by a collagen membrane
148 (Bio-Gide®), or ii) defect filled with the bone graft substitute (GlycoBone®), then covered by
149 the polysaccharide membrane (GlycoMembrane), ($n = 12$ maxillae per condition). *In vivo*
150 micro-computed tomography was performed for up to 12 weeks to investigate bone
151 regeneration. At the last timepoint, animals were sacrificed by intracardiac injection of sodium
152 pentobarbital (200 mg/kg). Maxillae were collected and fixed overnight in PFA 4% (Antigenfix,
153 Diapath, France) at 4°C.

154 2.4. *In vivo* radiographic assessment of the rat maxillae

155 2.4.1. *In vivo* longitudinal scanning

156 *In vivo* micro-computed tomography (micro-CT) (SkyScan 1276, Bruker, United-States) was
157 performed for up to 12 weeks to follow longitudinally the bone defect regeneration. Under
158 general anesthesia (isoflurane 2-3 % (v/v) in air/oxygen), rats were placed in decubitus in the
159 scan stage. All micro-CT scans were conducted at an accelerating voltage of 80 kV with a
160 current of 200 μ A to obtain a resolution of 42 μ m using an Al+Cu filter [41]. Micro-CT
161 acquisitions were performed the day after the surgery (T0), and then after 2, 4, 6, 8, and 12

162 weeks post-operatively. After image acquisition, the data were reconstructed with the NRecon
163 software (version 1.7.1, Bruker, United-States). Correction for post-alignment was optimized
164 per scan if needed. Smoothing level, ring-artifact reduction, and beam hardening were applied
165 with 1, 4, and 20 % values, respectively [42]. The dynamic image range of the histogram was
166 set from -1000 to 17000 HU. Files were exported to DICOM format for radiographic analysis.

167 2.3.2. Micro-CT analysis

168 The cross-sectional slices were visualized using the VGSTUDIO MAX® software (version
169 2022.3, Volume Graphics, Germany). First, 3D images obtained from the T0 timepoint were
170 used to face the defect on the sagittal plane. A cylindrical volume of interest (VOI) was drawn
171 according to the three different tested diameters (2.8 mm, 3.3 mm and 4.5 mm) and with 330-
172 µm in depth to fit the initial surgical defect. Due to the longitudinal follow-up for the same
173 defect, the orientation of the previous timepoint was used to face the defect using the “Best fit
174 registration” tool on VGSTUDIO MAX software. Then, bone volume fraction (BVF, ratio
175 between bone volume and total volume, expressed in percentage) was computed for each
176 timepoint (T0, 2, 4, 6, 8, and 12 weeks) from the extracted VOI. In some defects, the incisor
177 root interfered with the VOI. To avoid over-estimation of BVF, the incisor root was segmented
178 using the growing seeded tool brush to erase its signal. Each scan was reconstructed using the
179 same calibration system to distinguish bone and background.

180 2.4. Histological analysis

181 Maxillae collected 12 weeks after the surgery were decalcified with EDTA-based Microdec®
182 (Diapath, France) for four weeks, under gentle agitation. Maxillae were cut in half to obtain
183 hemi-maxillae. Samples were then dehydrated in increasing ethanol baths and processed for
184 embedding in paraffin. Coronal cuts of rat hemi-maxillae were made to obtain 7-µm-thick serial
185 sections in the middle of the defect. Masson-Goldner’s trichrome staining was used to visualize

186 bone formation at the defect site [43]. Briefly, sections were stained with Mayer's hemalum
187 solution (Sigma, United-States) for 4 min and rinsed in tap water. After, they were placed in
188 ponceau S 0.2 % / fuchsin acid 0.1 % solution for 3 min. Differentiation of the tissues was
189 obtained using orange G 2 % / phosphomolybdic acid 5 % solution for 1 min 30 s. Slides were
190 finally stained in light green 1 % solution for 6 min.

191 Picrosirius red staining was also performed to further observe collagen fibers' orientation.
192 Brightfield images were obtained using a slide scanner (Nanozoomer 2.0, Hamamatsu
193 Photonics, France). Sections stained with picrosirius red were observed under crossed
194 polarizing filters on a Nikon microscope (Eclipse 80i, Nikon, Japan). This method, relying on
195 the birefringence of collagen fibers, is used in combination with polarized light microscopy to
196 specifically highlight collagen networks [44,45].

197 2.5. Statistical analysis

198 Results were expressed as mean \pm SD and "n" indicated the number of defects tested. The
199 GraphPad Prism Software 8.2.0. (La Jolla/CA, USA) was used to perform statistical analysis.
200 We first performed a normality test using a D'Agostino and Pearson omnibus normality test.
201 Differences for independent samples were evaluated with the non-parametric Kruskal-Wallis
202 test and Dunn's multiple comparison test. The non-parametric Mann-Whitney test (two-tailed)
203 was used to compare two groups. Differences were considered significant and indicated with *
204 when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), and $p < 0.0001$ (****).

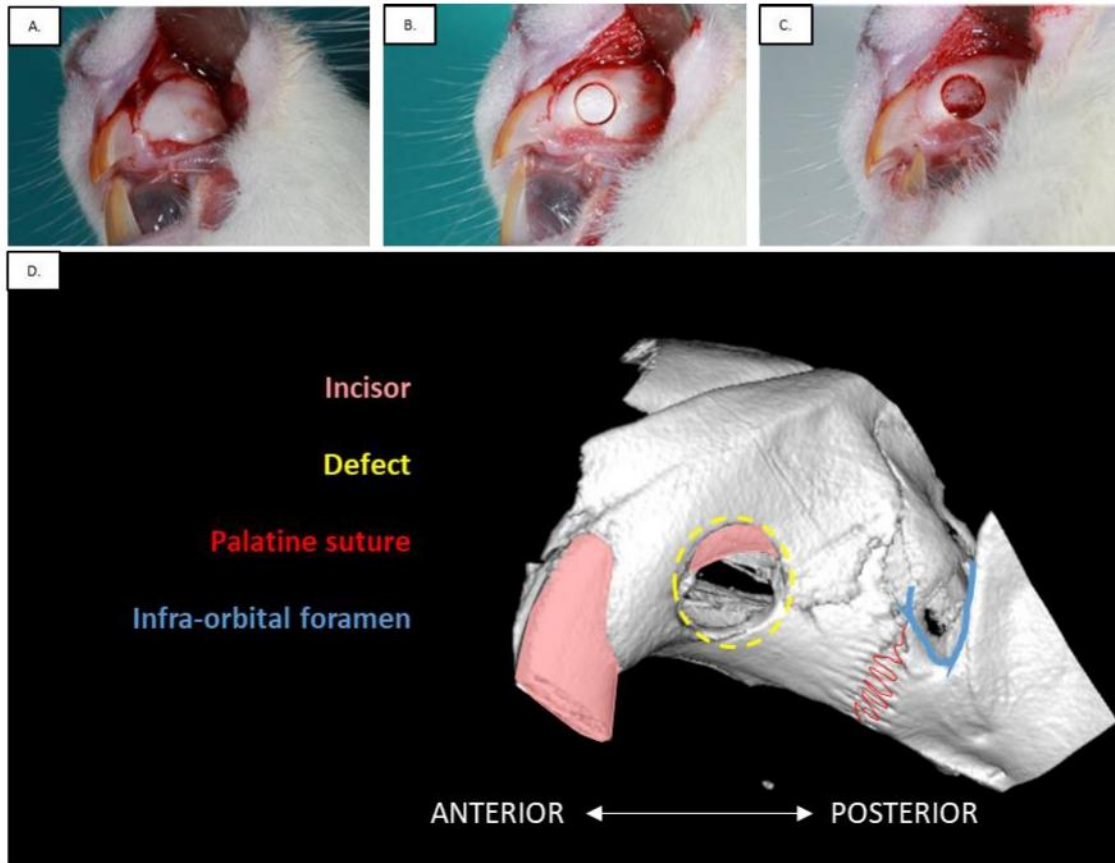
205

206 3. Results

207 3.1. Validation of a new reproducible critical-size defect model in rat maxillary

208 3.1.1. Surgical evaluation

209 The different steps of the surgical procedure are described in Figure 1 (1A - 1C). The anatomical
210 features composing the maxillary bone are visible in Figure 1D. All animals ($n = 12$) tolerated
211 well the surgery, whether the defect was left empty or filled with the materials. They did not
212 show any wound complication post-operatively. No infection was detected at any time after
213 surgery, nor masticatory dysfunction.



214

215 **Figure 1:** Experimental procedure of the alveolar defect surgery in rat maxillary. **A:** Incision
216 of the gum was performed to raise a full-thickness flap and expose the bone. **B:** Bone defect
217 was created using the appropriate size trephine burr. **C:** Alveolar bone was removed and
218 haemostasis was performed. **D:** Anatomical features of the maxilla in rat.

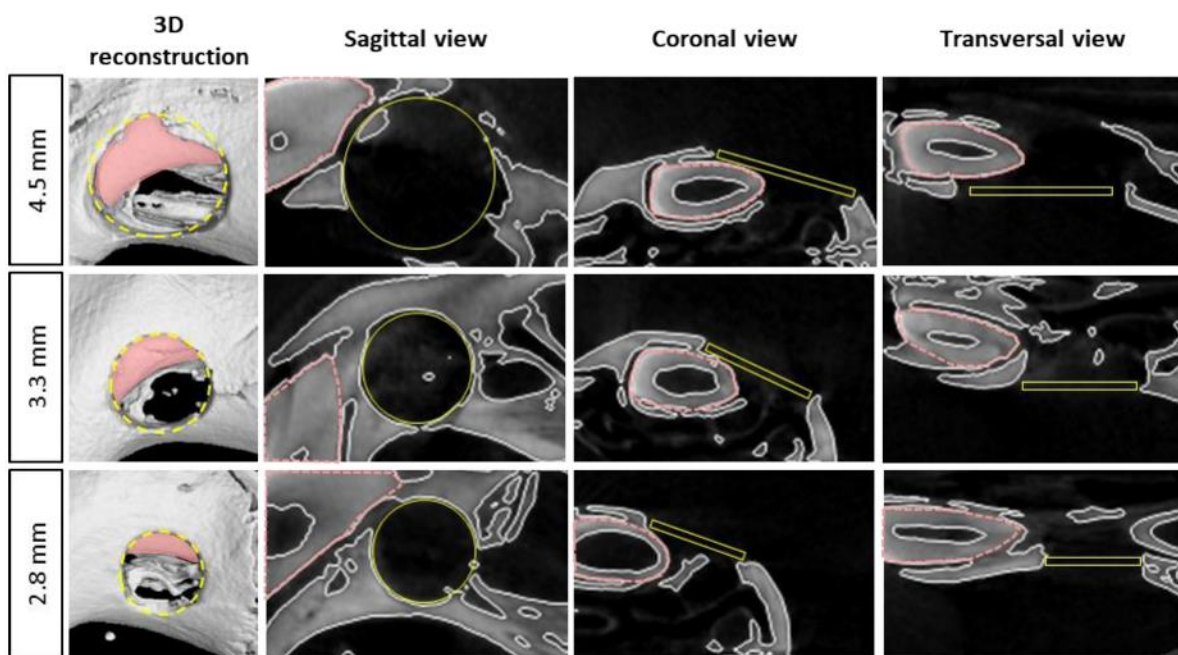
219

220 To ensure reproducibility, the defect was positioned antero-posteriorly between the incisor
221 crown and the palatine suture. Depending on the trephine bur size, accessibility to the maxilla

222 was challenging. Therefore, the smallest size defect of 2.8 mm in diameter was the easiest to
223 perform, showing the most reproducible location.

224 3.1.2. Micro-CT analysis of mineralized newly formed tissue within the three different size
225 bone defect models

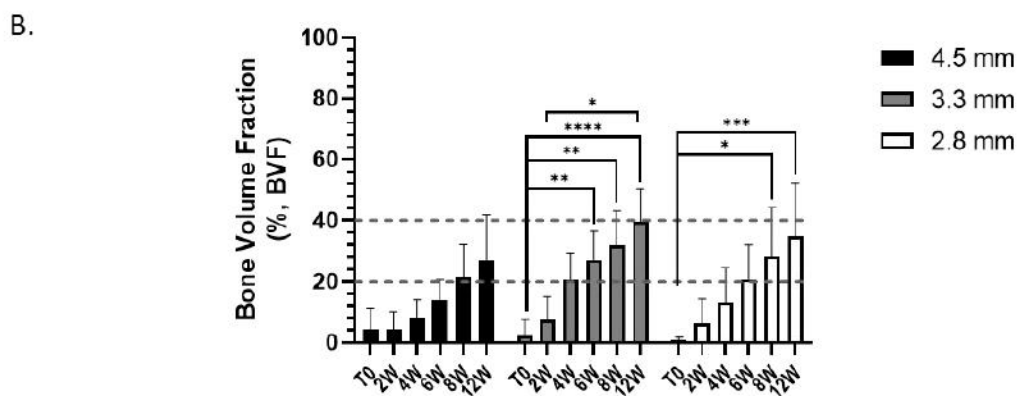
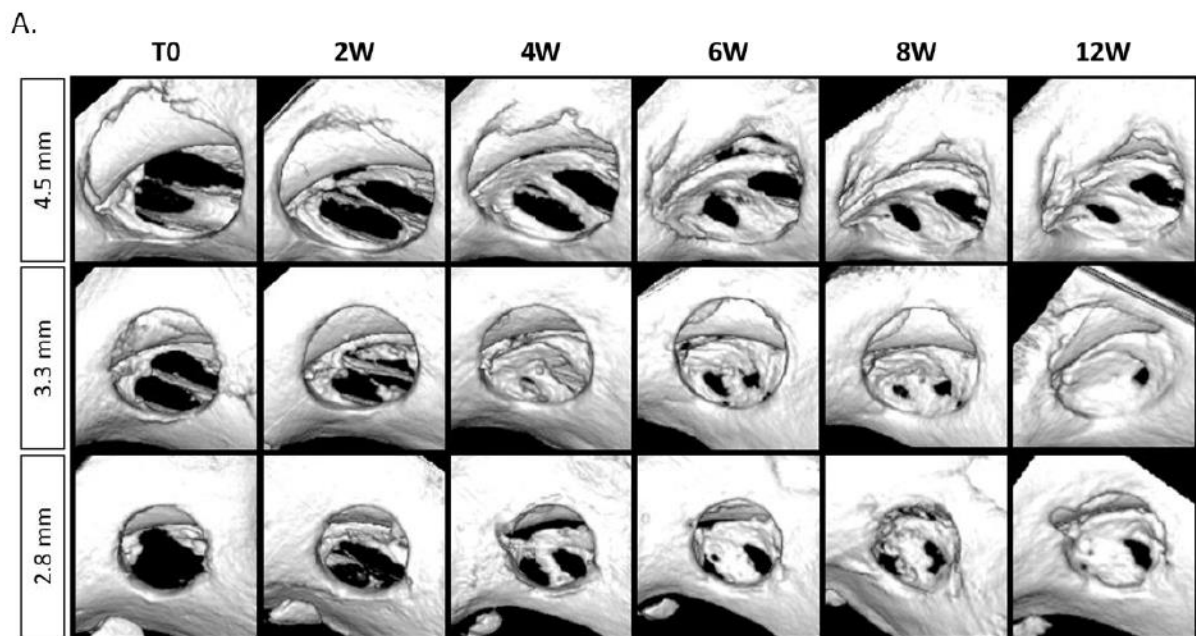
226 Representative 3D reconstructions and 2D planes of the three defect size models, as well as the
227 VOI location to fit the defect, are shown in Figure 2. As observed in coronal sections, VOI
228 position may include the incisor root, thereby requiring incisor segmentation for further
229 quantification of the BVF.



230
231 **Figure 2:** Radiological representation of the different size bone defects in the maxillary bone -
232 3D reconstruction and 2D views of the different size defects on rat's maxilla at the middle of
233 the defect using micro-CT images, pink dotted lines represent the incisor, yellow circles and
234 rectangles represent the computed volume of interest (VOI) for micro-CT analysis.

235

236 Longitudinal follow-up of the defects was investigated until 12 weeks post-surgery (Figure 3).
 237 Few spontaneous mineralized tissues were observed inside the empty defects until 4 weeks,
 238 whatever the defect size (with a BVF lower than 20 %). BVF analysis highlighted a slow
 239 regeneration rate from 6 to 12 weeks, without significant enhancement overtime, never reaching
 240 more than 40 % of the total VOI (at 6W BVF [%]: 4.5mm = 13.99 ± 6.64 %; 3.3 mm = 26.98
 241 ± 9.71 %; 2.8 mm = 20.77 ± 11.30 %, and at 12W BVF [%]: 4.5mm = 26.92 ± 15.16 %; 3.3
 242 mm = 39.48 ± 11.07 %; 2.8 mm = 34.85 ± 17.29 %). Incomplete mineralization was observed
 243 until the last timepoint regardless of the diameters of the defects, highlighting the critical size
 244 of the model.



245

246 **Figure 3:** Longitudinal micro-CT analysis of alveolar bone defect regeneration, left empty
247 according to the three defect sizes. **A:** 3D reconstruction of the defects at different timepoints.
248 **B:** Micro-CT analysis of the Bone Volume Fraction at different timepoints ($n = 8$ / condition),
249 non-parametric Kruskal-Wallis test compared within the same defect size, * $p < 0.05$, ** $p <$
250 0.01 , *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

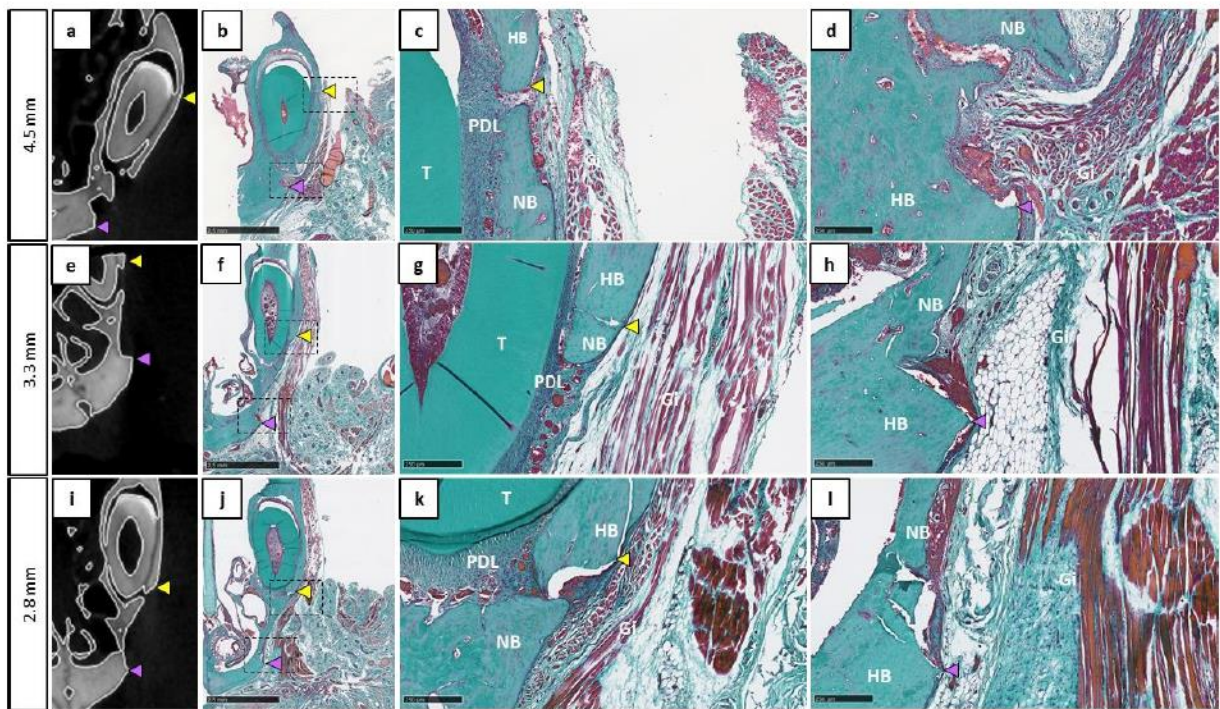
251

252 Additionally, we observed that the defect of 2.8 mm diameter was the most reliable and
253 reproducible for the surgeon since the defect was not to close from the crown of the incisor or
254 from the palatine suture. Larger defects showed to be mispositioned (*e.g.*, if the defect was too
255 close from the incisor or the palatine suture, resorption of the defect happened), and were often
256 oversized (data not shown).

257 3.1.3. Histological analysis of newly formed tissue within the three different size bone defects
258 in the maxillary rat model

259 Qualitative analysis of histological staining at the end of the experiment (12 weeks) for the
260 different size bone defects left empty at the beginning of the surgery was consistent with the
261 radiological results (Figure 4). The three conditions (*i.e.*, the three tested size defects) showed
262 the absence of complete bone regeneration and revealed only an immature newly bone tissue.
263 The defect was mainly filled by a disorganized bone and connective tissue. The edges of the
264 defects were sometimes difficult to distinguish due to bone thinning, especially with the 4.5
265 mm diameter for which clear delimitation of the upper edges was challenging.

266 Finally, the maxillary bone defect of 2.8 mm diameter demonstrated to have a critical size, and
267 was the easiest to perform during the surgery, allowing reproducible radiological and
268 histological analysis. Consequently, it was selected for testing biomaterials in further analysis.



269

270 **Figure 4:** Histological evaluation of the different bone defect sizes left empty at 12 weeks post-
 271 operation. (a, e, i): Coronal 2D images showing approximately the middle of the defect 12W
 272 after surgery. (b, f, j): Corresponding histological sections stained by Masson-Goldner's
 273 trichrome (scale bar: 2.5 mm). (c, d, g, h, k, l): Magnification view at the edges of the defect
 274 (scale bar: 250 μ m), yellow arrowheads represent the upper defect edge, purple arrowheads
 275 represent the lower defect edge, Gi: gingiva, HB: host bone, NB: new bone, PDL: periodontal
 276 ligament, T: tooth.

277

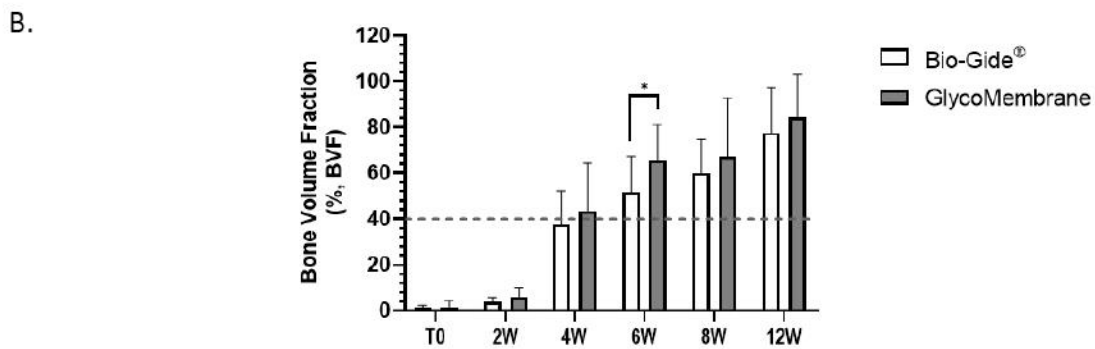
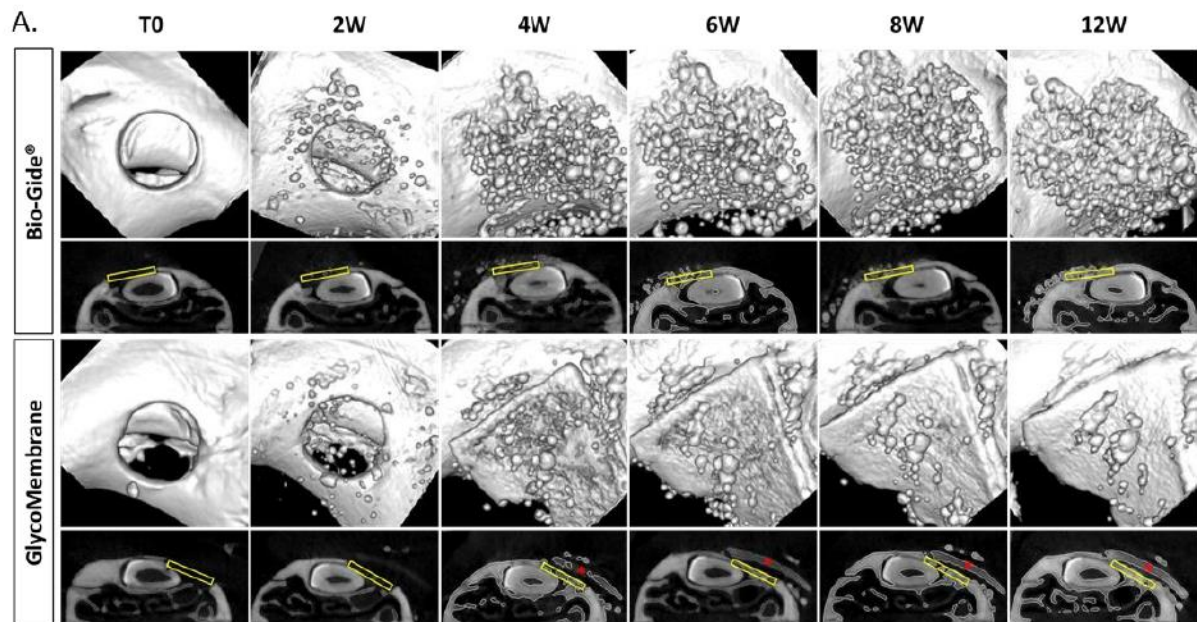
278 3.2. Assessment of bone regeneration after BTE materials implantation within the bone defect
 279 in the maxillary rat model

280 3.2.1. Micro-CT analysis of bone regeneration after GBR procedure

281 BTE materials were then implanted in 12 rats with the previously selected maxillary bone defect
 282 model of 2.8 mm diameter to validate its suitability to study various types of materials for oral
 283 bone regenerative applications. GBR procedure was performed by filling the defects with the

284 bone substitute (Glycobone®) already known for its osteoconductive properties, and covered
285 either by a commercially available and widely used collagen membrane (Bio-Gide®), or by a
286 new pullulan/dextran-based membrane containing hydroxyapatite (GlycoMembrane).

287 The implanted Glycobone® bone substitute is known for its initial radiolucent properties [16],
288 thereby allowing to follow its progressive mineralization, as demonstrated in the 3D
289 reconstructed images (Figure 5). Since GlycoMembrane shared similar composition with the
290 microbeads, mineralization of the membrane could also be monitored, as the membrane was
291 clearly distinguishable from the microbeads. Membrane mineralization started to be observed
292 at 4 weeks after the surgery. Bone regeneration was similar, regardless of the membrane used
293 to cover the bone substitute for up to 4 weeks. In contrast, bone regeneration was significantly
294 greater six weeks after the surgery when the bone substitute was covered by the
295 GlycoMembrane compared to the commercial membrane Bio-Gide® (at 6W BVF [%]: Bio-
296 Gide = 51.71 ± 15.55 % and GlycoMembrane = 65.43 ± 15.08 %, $p < 0.05$). Finally, a gradual
297 bone regeneration was observed in both conditions until the late timepoint (at 12W BVF [%]:
298 Bio-Gide = 77.63 ± 19.69 % and GlycoMembrane = 84.08 ± 18.90 %). Micro-CT analysis also
299 showed that both membranes successfully maintained the filling material inside the bone defect.



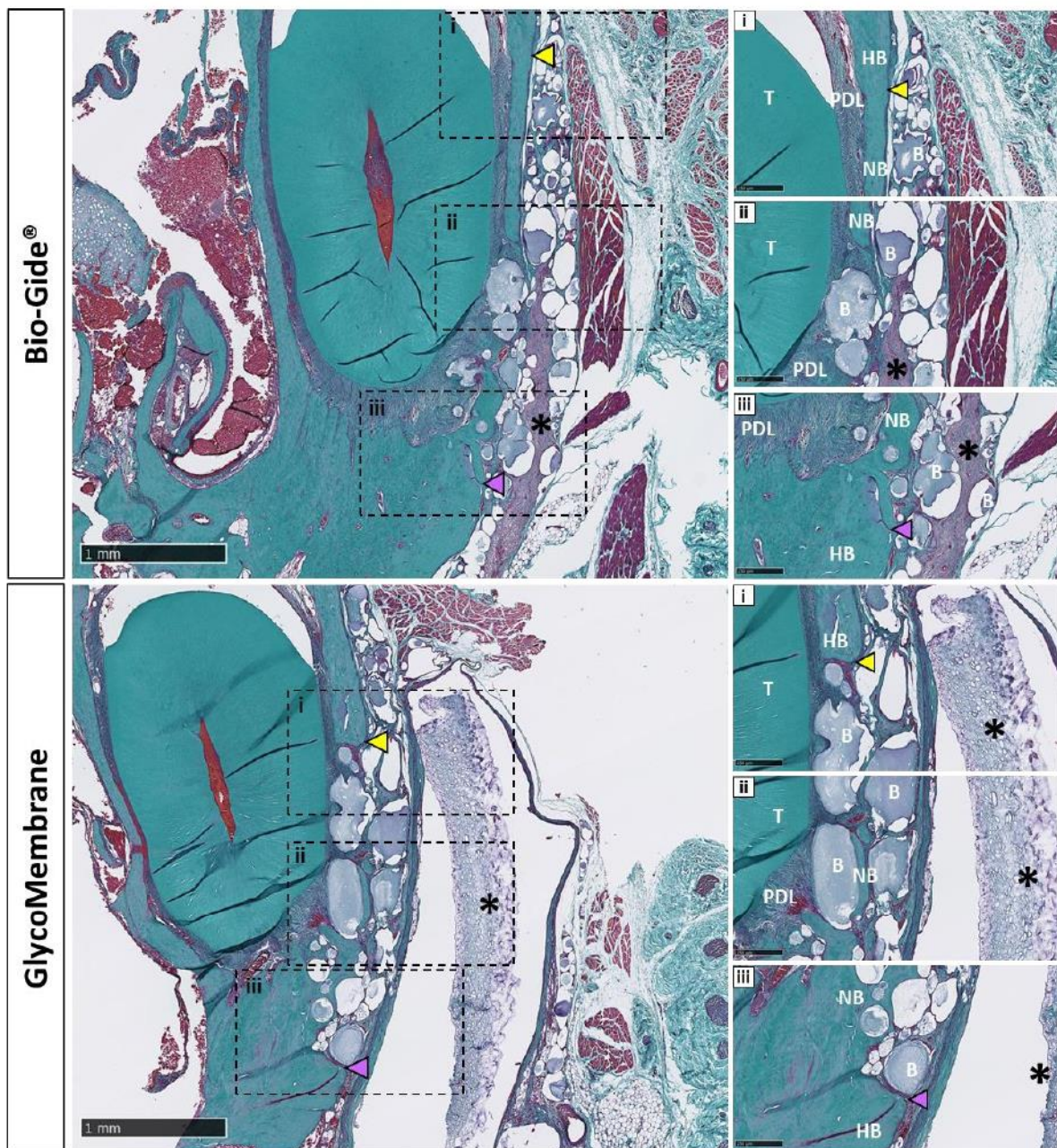
300

301 **Figure 5:** Longitudinal micro-CT analysis of alveolar bone defect after GBR procedure. **A:** 3D
 302 reconstruction and 2D coronal sections of the defects filled with GlycoBone® and covered by
 303 a membrane (Bio-Gide® or GlycoMembrane) at the different timepoints. The yellow rectangles
 304 represent the region of interest (ROI) and the red asterisks represent the residual membrane. **B:**
 305 Micro-CT analysis of the Bone Volume Fraction at different timepoints ($n = 11$ for Bio-Gide®
 306 and $n = 12$ for GlycoMembrane), non-parametric Mann-Whitney test, * $p < 0.05$.

307

308 3.2.2. Histological analysis of the maxillary rat model after GBR procedure

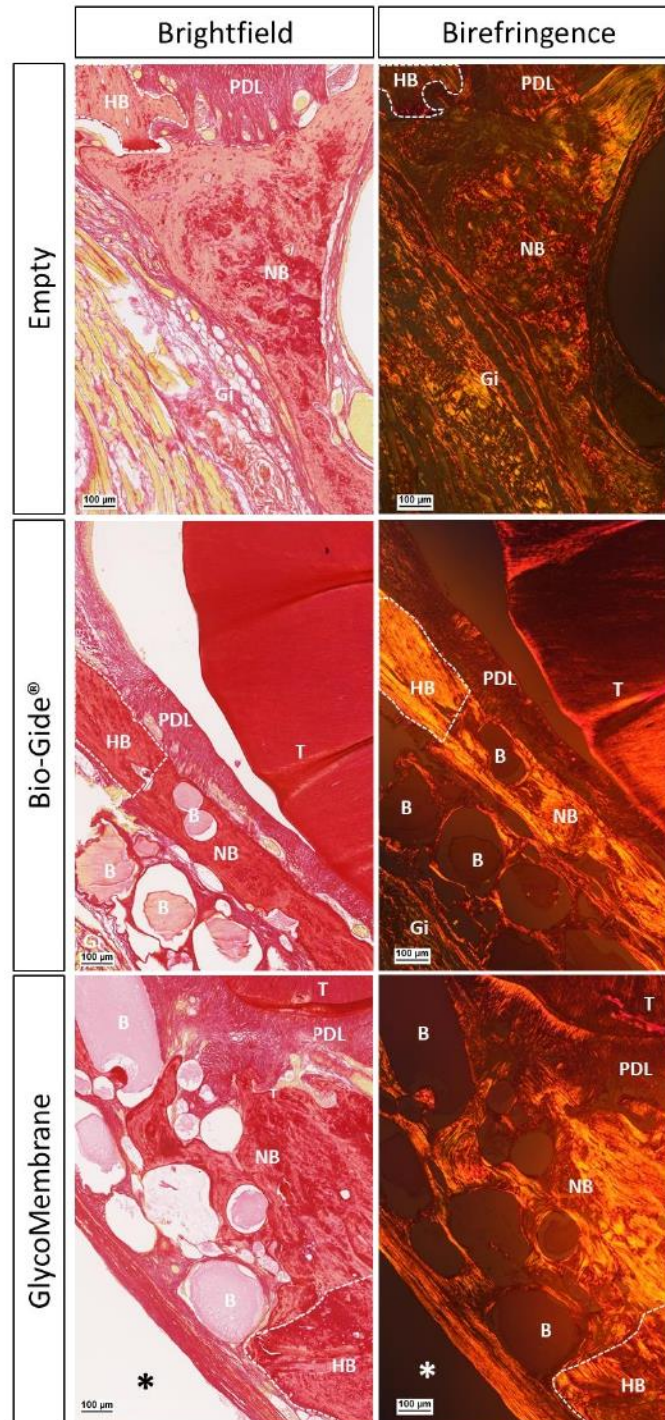
309 Histological sections of the 2.8 mm defects filled with GlycoBone® and covered either by
310 GlycoMembrane, or by the collagen membrane (Bio-Gide®) were stained by Masson-
311 Goldner's trichrome 12 weeks after the surgery (Figure 6). Defects were mainly filled by the
312 microbeads which showed excellent integration into the host tissue and were in close contact
313 with native and newly formed bone. A well-organized lamellar bone was thus observed around
314 microbeads. Both membranes were integrated into the surrounding tissue, keeping microbeads
315 inside the defect. The collagenous membrane Bio-Gide® was colonized by the surrounding
316 cells overtime, leading to its resorption. Interestingly, the polysaccharide membrane
317 (GlycoMembrane) maintained its barrier function for longer, with no cellular infiltration
318 observed for up to 12 weeks. A thin fibrotic capsule was observed around GlycoMembrane.
319 However, no inflammatory cells were observed around the membrane as previously reported
320 [38]. For both membrane conditions, new bone formation was observed after 12 weeks in direct
321 contact with the microbeads.



322

323 **Figure 6:** Histological evaluation of the different bone defect filled with GlycoBone® and
 324 covered by a membrane (Bio-Gide® or GlycoMembrane), showing consistent bone formation
 325 inside the defect and around the micro-beads after 12 weeks (scale bar: 1 mm). **i, ii, iii:** Higher
 326 magnification view at the edges of the defect (scale bar: 250 µm). Black asterisks represent
 327 remaining membrane, yellow arrowheads represent the upper defect edge, purple arrowheads
 328 represent the lower defect edge, B: microbeads, Gi: gingiva, HB: host bone, NB: new bone,
 329 PDL: periodontal ligament, T: tooth.

330 Tissue sections were also stained using picosirius red to evidence collagen fiber orientation
 331 around the tested materials compared to the empty defect (2.8 mm) (Figure 7). Qualitative
 332 analysis under polarized light showed woven bone with unorganized collagen fibers inside the
 333 empty defect area, whereas osteoid tissue formation and lamellar tissue with parallel organized
 334 collagen fibers were evidenced in the bone defects filled using GBR procedure.



335

336 **Figure 7:** Picrosirius red staining to evidence collagen fibers orientation inside the alveolar
337 defects left empty or covered with a membrane (Bio-Gide® or GlycoMembrane) at 12W post-
338 surgery (scale bar: 100 μ m). Histological sections under brightfield view and polarized light
339 view (birefringence and grayscale modes) of the slides for defect left empty or covered by a
340 membrane. Black and white asterisks represent remaining membrane, white dotted lines
341 represent defect edges, B: microbeads, Gi: gingiva, HB: host bone, NB: new bone, PDL:
342 periodontal ligament, T: tooth.

343

344 **4. Discussion**

345 This study aimed to develop a reproducible critical maxillary bone defect in rats and validate
346 this model to study BTE materials. The first part of the study focused on the step-by-step
347 description of the experimental model, and intended to determine the most appropriate size and
348 time for the bone defect for bone reconstruction. The second part highlighted the successful
349 application of this model to evaluate innovative biomaterials to regenerate bone in oral and
350 maxillofacial surgery.

351 The first goal was to develop a critical maxillary bone defect model. To this end, three different
352 size defects (*i.e.*, diameter of 2.8, 3.3, and 4.5 mm) were analyzed comparing the surgical
353 feasibility and bone regeneration. Maxilla was chosen as it offers easy access to the alveolar
354 bone without damaging surrounding tissues and provides sufficient bone volume to test
355 biomaterials. To facilitate the surgical technique and ensure optimum shape reproducibility, a
356 circular defect was chosen. Firstly, bone regeneration analysis showed that the three defects
357 could be considered critical size defects. The term "critical size defect" can refer to the smallest
358 defect size that cannot spontaneously heal [22]. However, there is often a lack of information
359 regarding animal models specifically designed to study critical size defects [46]. This is

360 primarily due to the fact that evaluating the smallest size defect is not consistently performed,
361 and experimental endpoints typically do not extend enough time [22]. In this study, the BVF
362 measured at the late timepoint (*i.e.*, 12 weeks) did not reach more than 40 % of regeneration
363 and complete healing was not observed in any of the conditions. Furthermore, bone repair did
364 not further increase significantly after six weeks of implantation. These three defects were thus
365 considered as critical. It was also observed that the defect of 2.8 mm of diameter was easier to
366 perform and to position correctly between the crown incisor and the palatine suture with the
367 smallest trephine bur. Consequently, this smallest defect size (2.8 mm diameter) was selected.

368 We then assessed this model as a reliable and reproducible way to investigate innovative bone
369 repair materials for oral surgery. For now, large animal models such as pig or sheep are usually
370 performed to test such devices for their similar physiological features and translation to human
371 needs [12,13,16,21]. For early-stage investigations, the cost-effectiveness and feasibility of
372 such models can be challenging for researchers. Also in accordance with the 3Rs principles,
373 which request avoiding large animal models when a small animal can fulfill the research
374 objectives [17,18], diverse types of rodent defects for maxillofacial surgery can be found.
375 However, their relevance for further application is questionable. The most well-established
376 defect models performed in rat maxillae are mid-palate cleft and alveolar cleft defects [29,30].
377 These models are limited to cleft palate research [47]. Another well-described model in rat
378 maxillary is the tooth extraction model that relies on the evaluation of alveolar bone
379 reconstruction after tooth extraction. This model also shows some limitations. First, the size of
380 the rat alveolar bone defect varied a lot between studies without consensus, and the volume of
381 bone to regenerate may vary between animals [48–52]. Depending on the site of extraction
382 (incisor [49,50] or first molar [51,52]), investigation of alveolar bone reconstruction may be
383 challenging to analyze. Alveolar bone induced problems in its quantification because of the
384 difficulty in distinguishing it from the surrounding dental and bone tissues [53]. To restore the

385 initial curvature of the maxillae, the design of specific biomaterials should consider both the
386 repair volume and the shape of the bone [25].

387 In our study, the tested materials aimed to mimic clinical conditions of GBR procedures by
388 combining a bone graft substitute with a membrane [54,55]. We used injectable microbeads
389 made from pullulan and dextran and combined with hydroxyapatite (GlycoBone®) as a bone
390 filling material. GlycoBone® was selected to fit the defect area, and it induced bone
391 regeneration. These microbeads were already tested in small (rat [35–37]) and large (sheep
392 [16,36]) mammal models. Great osteoconductive properties were evidenced with newly formed
393 bone around the microbeads. To improve their efficacy, a membrane with a similar formulation
394 was developed [38], and then applied here to this bone defect.

395 Two membranes intended for GBR procedures were thus tested in this model: an already
396 commercialized (Bio-Gide®), and another one under development (GlycoMembrane) [38].
397 These membranes need to keep their whole integrity at least 16 to 24 weeks to maintain their
398 barrier function required by GBR procedures for bone ingrowth [56]. Micro-CT acquisitions
399 enabled in this study to follow the progressive mineralization of GlycoBone® (bone filling
400 material) as well as GlycoMembrane (membrane that covered the defect), as they demonstrated
401 similar composition and were radiolucent at T0. These two materials could clearly be
402 distinguished on the 2D scan coronal sections *in vivo* enabling to register the bone formation
403 inside the defect. However, this follow-up could not be performed for Bio-Gide® since no
404 mineralization of this membrane was expected. Quantitatively, BVF ratio for BTE material
405 implantation doubled at the endpoint compared to the defect left empty (BVF around 80 % for
406 defect filled with bone substitute *vs* BVF under 40 % for defect left empty). Qualitatively on
407 histological sections, disorganized bone structures with woven bone was evidenced on defects
408 left empty compare to defects filled with GlycoBone®. Previous studies already highlighted
409 the osteoconductive role of GlycoBone® that drive collagen fibers orientation around the

410 microbeads (Figure 7) [16,35]. Micro-CT analysis showed similar results whatever the
411 membrane used to cover the bone substitute, except at 6 weeks where BVF was significantly
412 increased with the polysaccharide membrane compared to the collagen one. Bio-Gide®, as well
413 as GlycoMembrane, demonstrated good tissue integration in the defect area and retained the
414 bone filling materials inside the defect, as demonstrated by histological analysis. As
415 longitudinal radiological follow-up was performed, histological analysis could only be achieved
416 at the final timepoint (*i.e.*, 12 weeks), thereby preventing to quantify membranes resorption
417 over time by histomorphometric analysis. However, few important data could be highlighted.
418 First, a large cellularization of the Bio-Gide® membrane was observed which suggesting a
419 faster resorption of the material before the required timepoint for GBR procedures (*i.e.*, 16–24
420 weeks accordingly to bone healing time). In parallel, a thin fibrotic layer appeared around
421 GlycoMembrane, but the membrane kept its integrity until the last timepoint. A previous study
422 already demonstrated the biocompatibility of GlycoMembrane with no inflammatory cells
423 around the membrane that remained stable for up to 16 weeks in a subcutaneous model
424 implantation in rats [38]. Our results showed here that this new polysaccharide membrane
425 (GlycoMembrane) was as effective as the commercial and widely used collagen membrane to
426 promote bone formation. GlycoMembrane played a crucial role in supporting bone ingrowth
427 and acting as a physical barrier to prevent soft tissue infiltration and retain the bone substitute
428 beads inside the defect area.

429 The preclinical model implemented here highlighted great interest to mimic GBR procedure in
430 order to achieve first-stage screening, by excluding candidate materials with unfavorable
431 performances. The possibility to combine a bone graft substitute and a GBR membrane was
432 evidenced in this study to investigate their efficiency in alveolar bone regeneration. The present
433 model provides a suitable environment to test new medical devices, and at the same time
434 considers the mechanical forces and load-bearing capacity applied to such devices.

435 Two main limitations of this study must be mentioned concerning radiographic and histological
436 analyses. Firstly, challenges concerning longitudinal follow-up using micro-CT analysis up to
437 12 weeks were encountered. Proper handling of animals was needed in order to obtain
438 repeatable acquisitions and good image quality [42,57,58]. Additionally, it was difficult to
439 differentiate incisor root from bone in the scans due to their similar gray values. The use of the
440 "growing seeded tool brush " during the analysis was thus required to accurately delineate the
441 incisor root and exclude its signal contribution to the BVF. Secondly, histomorphometric
442 analysis of new bone formation was not pursued due to the complexity to underline the edges
443 of the defects, especially in the region between the tooth root and the inferior part of the alveolar
444 bone. This could be explained by the late histological analysis. Indeed, this investigation was
445 limited to a single timepoint for histological analysis (final endpoint - 12 weeks) to minimize
446 animal use, where the mature bone was already synthesized, making it difficult to visualize the
447 limits between native and newly formed bone. Therefore, intermediate timepoints (*e.g.*, 4 and
448 8 weeks) could be considered for further histomorphometric quantifications [59].

449

450 **Conclusion**

451 This study established a standardized critical bone defect model in rat maxillary for assessing
452 biomaterials in oral and maxillofacial surgery. The 2.8 mm diameter defect provided
453 reproducibility, and the position of the defect in the maxilla enabled the investigation of alveolar
454 bone regeneration while considering mechanical forces and load-bearing capacity. The use of
455 this rat model for maxillary bone defect allows an ethically aligned approach and minimizes
456 invasiveness compared to existing models. Furthermore, this new bone defect model was
457 validated to test innovative biomaterials for GBR applications in oral and maxillofacial surgery,
458 as demonstrated by the successful implantation and analyses of a bone substitute covered by
459 two different membranes. The development of this standardized small animal model should

460 thus be considered as a first step in the evaluation and validation of new biomaterials for bone
461 regeneration in oral and maxillofacial surgery before the use of larger mammals or clinical
462 study.

463 **Acknowledgment**

464 The authors would like to thank the ANR (Agence Nationale de la Recherche) for financial
465 support (project n°ANR-20-CE18-0034). The authors also acknowledged Siltiss and Nouvelle-
466 Aquitaine region. This work was in part funded by the H2020-NMBP-HUBS-2018 TBMED
467 project (Grant Agreement No. 814439). The authors acknowledge Laëtitia Medan as manager
468 of the animal facility in Bordeaux and Fanny Bourree, Céline Ayez, and Benjamin Pere of the
469 animal facility in Pessac. The authors thank Richard Walton for his expertise and guidance in
470 acquiring the micro-CT data sets and the IHU Liryc Institute (University of Bordeaux, Pessac,
471 France) for access to the scanner. The authors thank Olivier Chassande for its expertise on
472 micro-CT analysis. The authors also thank Annina Luck, Emmanuel Ormea, and Nicolas
473 Coutant for technical support on the VGSTUDIO MAX software. Acquisition of histological
474 images with the slide scanner (Nanozoomer) was performed in the Bordeaux Imaging Center
475 (a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University) with the help of Sébastien
476 Marais.

477 **Funding sources**

478 This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [project number
479 ANR-20-CE18-0034] and the H2020-NMBP-HUBS-2018 TBMED project [Grant Agreement
480 numbers 814439].

481 **Conflict of interest**

482 The authors declare that this study received funding from SILTISS. The funder had the
483 following involvement in the study: Partial funding of Ph.D. for NAO.

484 **Bibliography**

- 485 [1] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current
486 concepts and future directions. *BMC Med* 2011;9:66. [https://doi.org/10.1186/1741-7015-](https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66)
487 9-66.
- 488 [2] Lanza R, Langer R, Vacanti J, editors. *Principles of Tissue Engineering*. 4th ed. Elsevier;
489 2014. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07193-4>.
- 490 [3] Mansour A, Al-Hamed FS, Torres J, Marino FT. Chapter 3 - Alveolar bone grafting:
491 Rationale and clinical applications. In: Alghamdi H, Jansen J, editors. *Dental Implants*
492 *and Bone Grafts*, Woodhead Publishing; 2020, p. 43–87. [https://doi.org/10.1016/B978-0-](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102478-2.00003-9)
493 08-102478-2.00003-9.
- 494 [4] Fenelon M, Gernandt S, Aymon R, Scolozzi P. Identifying Risk Factors Associated with
495 Major Complications and Refractory Course in Patients with Osteomyelitis of the Jaw: A
496 Retrospective Study. *Journal of Clinical Medicine* 2023;12:4715.
497 <https://doi.org/10.3390/jcm12144715>.
- 498 [5] Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of
499 deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 Suppl
500 2:136–59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01357.x>.
- 501 [6] Abtahi S, Chen X, Shahabi S, Nasiri N. Resorbable Membranes for Guided Bone
502 Regeneration: Critical Features, Potentials, and Limitations. *ACS Mater Au* 2023.
503 <https://doi.org/10.1021/acsmaterialsau.3c00013>.
- 504 [7] Baj A, Trapella G, Lauritano D, Candotto V, Mancini GE, Gianni AB. An overview on
505 bone reconstruction of atrophic maxilla: success parameters and critical issues. *J Biol*
506 *Regul Homeost Agents* 2016;30:209–15.

- 507 [8] Gómez S, Vlad MD, López J, Fernández E. Design and properties of 3D scaffolds for
508 bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2016;42:341–50.
509 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.032>.
- 510 [9] Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies
511 and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2018;80:1–30.
512 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>.
- 513 [10] Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, et al. Biomaterials
514 and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region:
515 Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone
516 Regeneration. *J Clin Periodontol* 2019;46 Suppl 21:82–91.
517 <https://doi.org/10.1111/jcpe.13123>.
- 518 [11] Shanbhag S, Pandis N, Mustafa K, Nyengaard JR, Stavropoulos A. Alveolar bone
519 tissue engineering in critical-size defects of experimental animal models: a systematic
520 review and meta-analysis. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11:2935–49.
521 <https://doi.org/10.1002/term.2198>.
- 522 [12] Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal
523 bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*
524 2011;49:591–9. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.007>.
- 525 [13] Gomez J, Bergamo ETP, Tovar N, Talib HS, Pippenger BE, Herdia V, et al.
526 Microtomographic reconstruction of mandibular defects treated with xenografts and
527 collagen-based membranes: A pre-clinical minipig model. *Medicina Oral Patologia Oral y*
528 *Cirugia Bucal* 2021;26:e825–33. <https://doi.org/10.4317/medoral.24811>.
- 529 [14] Unnikrishnan PS, Iyer S, Manju V, Reshmi CR, Menon D, Nair SV, et al.
530 Nanocomposite fibrous scaffold mediated mandible reconstruction and dental

- 531 rehabilitation: An experimental study in pig model. *Biomaterials Advances*
532 2022;133:112631. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112631>.
- 533 [15] Vdoviaková K, Jenca A, Jenca A Jr, Danko J, Kresáková L, Simaiová V, et al.
534 Regenerative Potential of Hydroxyapatite-Based Ceramic Biomaterial on Mandibular
535 Cortical Bone: An In Vivo Study. *Biomedicines* 2023;11.
536 <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030877>.
- 537 [16] Fricain JC, Aid R, Lanouar S, Maurel DB, Le Nihouannen D, Delmond S, et al. In-
538 vitro and in-vivo design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite
539 composite material for sinus floor augmentation. *Dental Materials* 2018;34:1024–35.
540 <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>.
- 541 [17] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National
542 Academies Press; 1996. <https://doi.org/10.17226/5140>.
- 543 [18] Burden N, Chapman K, Sewell F, Robinson V. Pioneering better science through the
544 3Rs: an introduction to the national centre for the replacement, refinement, and reduction
545 of animals in research (NC3Rs). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2015;54:198–208.
- 546 [19] Zeiter S, Koschitzki K, Alini M, Jakob F, Rudert M, Herrmann M. Evaluation of
547 Preclinical Models for the Testing of Bone Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Eng*
548 *Part C Methods* 2020;26:107–17. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2019.0213>.
- 549 [20] Kim J-H, Kim H-W. Rat defect models for bone grafts and tissue engineered bone
550 constructs. *Tissue Eng Regen Med* 2013;10:310–6. <https://doi.org/10.1007/s13770-013-1093-x>.
- 551
552 [21] Hatt LP, Thompson K, Helms JA, Stoddart MJ, Armiento AR. Clinically relevant
553 preclinical animal models for testing novel cranio-maxillofacial bone 3D-printed
554 biomaterials. *Clin Transl Med* 2022;12:e690. <https://doi.org/10.1002/ctm2.690>.

- 555 [22] Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of
556 bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc* 2012;7:1918–29.
557 <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113>.
- 558 [23] Fénelon M, Chassande O, Kalisky J, Gindraux F, Brun S, Bareille R, et al. Human
559 amniotic membrane for guided bone regeneration of calvarial defects in mice. *J Mater Sci*
560 *Mater Med* 2018;29:78. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6086-9>.
- 561 [24] Zhao J, Zhou Y-H, Zhao Y-Q, Gao Z-R, Ouyang Z-Y, Ye Q, et al. Oral cavity-derived
562 stem cells and preclinical models of jaw-bone defects for bone tissue engineering. *Stem*
563 *Cell Res Ther* 2023;14:39. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03265-z>.
- 564 [25] Liu G, Guo Y, Zhang L, Wang X, Liu R, Huang P, et al. A standardized rat burr hole
565 defect model to study maxillofacial bone regeneration. *Acta Biomater* 2019;86:450–64.
566 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.049>.
- 567 [26] Ma S, Li J, Guo Y, Huang Y, Chi X, Wei Y, et al. Three-dimensional radiographic and
568 histological tracking of rat mandibular defect repair after inferior alveolar nerve axotomy.
569 *Arch Oral Biol* 2021;131:105252. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105252>.
- 570 [27] Taguchi T, Lopez MJ. An overview of de novo bone generation in animal models. *J*
571 *Orthop Res* 2021;39:7–21. <https://doi.org/10.1002/jor.24852>.
- 572 [28] Padial-Molina M, Rodriguez JC, Volk SL, Rios HF. Standardized in vivo model for
573 studying novel regenerative approaches for multitissue bone–ligament interfaces. *Nat*
574 *Protoc* 2015;10:1038–49. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.063>.
- 575 [29] Nguyen PD, Lin CD, Allori AC, Ricci JL, Saadeh PB, Warren SM. Establishment of a
576 critical-sized alveolar defect in the rat: a model for human gingivoperiosteoplasty. *Plast*
577 *Reconstr Surg* 2009;123:817–25. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31819ba2f4>.

- 578 [30] Toyota A, Shinagawa R, Mano M, Tokioka K, Suda N. Regeneration in Experimental
579 Alveolar Bone Defect Using Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Cell*
580 *Transplant* 2021;30:963689720975391. <https://doi.org/10.1177/0963689720975391>.
- 581 [31] Liu G, Zhou X, Zhang L, Zou Y, Xue J, Xia R, et al. Cell-free immunomodulatory
582 biomaterials mediated in situ periodontal multi-tissue regeneration and their
583 immunopathophysiological processes. *Mater Today Bio* 2022;16:100432.
584 <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100432>.
- 585 [32] Nie L, Zhang H, Ren A, Li Y, Fu G, Cannon RD, et al. Nano-hydroxyapatite
586 mineralized silk fibroin porous scaffold for tooth extraction site preservation. *Dent Mater*
587 2019;35:1397–407. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.07.024>.
- 588 [33] Wheelis SE, Biguetti CC, Natarajan S, Arteaga A, El Allami J, Lakkasettar
589 Chandrashekar B, et al. Cellular and Molecular Dynamics during Early Oral
590 Osseointegration: A Comprehensive Characterization in the Lewis Rat. *ACS Biomater Sci*
591 *Eng* 2021;7:2392–407. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01420>.
- 592 [34] Raposo-Amaral CE, Bueno DF, Almeida AB, Jorgetti V, Costa CC, Gouveia CH, et
593 al. Is bone transplantation the gold standard for repair of alveolar bone defects? *J Tissue*
594 *Eng* 2014;5:2041731413519352. <https://doi.org/10.1177/2041731413519352>.
- 595 [35] Schlaubitz S, Derkaoui SM, Marosa L, Miraux S, Renard M, Catros S, et al.
596 Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle
597 defect in rats. *PLoS One* 2014;9:e110251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110251>.
- 598 [36] Maurel DB, Fénelon M, Aid-Launais R, Bidault L, Le Nir A, Renard M, et al. Bone
599 regeneration in both small and large preclinical bone defect models using an injectable
600 polymer-based substitute containing hydroxyapatite and reconstituted with saline or
601 autologous blood. *J Biomed Mater Res A* 2021. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37176>.

- 602 [37] Ribot EJ, Tournier C, Aid-Launais R, Koonjoo N, Oliveira H, Trotier AJ, et al. 3D
603 anatomical and perfusion MRI for longitudinal evaluation of biomaterials for bone
604 regeneration of femoral bone defect in rats. *Sci Rep* 2017;7:6100.
605 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06258-0>.
- 606 [38] Ahmed Omar N, Roque J, Galvez P, Siadous R, Chassande O, Catros S, et al.
607 Development of Novel Polysaccharide Membranes for Guided Bone Regeneration: In
608 Vitro and In Vivo Evaluations. *Bioengineering* 2023;10:1257.
609 <https://doi.org/10.3390/bioengineering10111257>.
- 610 [39] Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, et al. A
611 nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material
612 for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2013;34:2947–59.
613 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.049>.
- 614 [40] Frasca S, Norol F, Le Visage C, Collombet J-M, Letourneur D, Holy X, et al.
615 Calcium-phosphate ceramics and polysaccharide-based hydrogel scaffolds combined with
616 mesenchymal stem cell differently support bone repair in rats. *J Mater Sci Mater Med*
617 2017;28:35. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5839-6>.
- 618 [41] Orhan K, de Faria Vasconcelos K, Gaêta-Araujo H. Artifacts in Micro-CT. In: Orhan
619 K, editor. *Micro-computed Tomography (micro-CT) in Medicine and Engineering*, Cham:
620 Springer International Publishing; 2020, p. 35–48. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16641-0_4)
621 [16641-0_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16641-0_4).
- 622 [42] Chatterjee M, Faot F, Correa C, Duyck J, Naert I, Vandamme K. A robust
623 methodology for the quantitative assessment of the rat jawbone microstructure. *Int J Oral*
624 *Sci* 2017;9:87–94. <https://doi.org/10.1038/ijos.2017.11>.
- 625 [43] Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 5th ed.
626 Scion; 2015.

- 627 [44] Liu J, Xu M, Wu J, Zhang H, Yang L, Lun D, et al. Picrosirius-Polarization Method
628 for Collagen Fiber Detection in Tendons: A Mini-Review. *Orthop Surg* 2021;13:701–7.
629 <https://doi.org/10.1111/os.12627>.
- 630 [45] Rittié L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in
631 Tissue Sections. *Methods Mol Biol* 2017;1627:395–407. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26.
- 632
- 633 [46] McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering
634 and modelling disease. *Dis Model Mech* 2018;11:dmm033084.
635 <https://doi.org/10.1242/dmm.033084>.
- 636 [47] Mostafa NZ, Doschak MR, Major PW, Talwar R. Reliable critical sized defect rodent
637 model for cleft palate research. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2014;42:1840–6.
638 <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2014.07.001>.
- 639 [48] Kandalam U, Kawai T, Ravindran G, Brockman R, Romero J, Munro M, et al.
640 Predifferentiated Gingival Stem Cell-Induced Bone Regeneration in Rat Alveolar Bone
641 Defect Model. *Tissue Eng Part A* 2021;27:424–36.
642 <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0052>.
- 643 [49] Shi P, Zhou W, Dong J, Li S, Lv P, Liu C. Scaffolds of bioactive glass (Bioglass®)
644 combined with recombinant human bone morphogenetic protein -9 (rhBMP-9) for tooth
645 extraction site preservation. *Heliyon* 2022;8.
646 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08796>.
- 647 [50] He G, Chen Z, Chen L, Lin H, Yu C, Zhao T, et al. Hydroxyapatite/calcium alginate
648 composite particles for hemostasis and alveolar bone regeneration in tooth extraction
649 wounds. *PeerJ* 2023;11:e15606. <https://doi.org/10.7717/peerj.15606>.

- 650 [51] Gu J-T, Jiao K, Li J, Yan J-F, Wang K-Y, Wang F, et al. Polyphosphate-crosslinked
651 collagen scaffolds for hemostasis and alveolar bone regeneration after tooth extraction.
652 *Bioactive Materials* 2022;15:68–81. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.12.019>.
- 653 [52] Niu Q, He J, Wu M, Liu J, Lu X, Zhang L, et al. Transplantation of bone marrow
654 mesenchymal stem cells and fibrin glue into extraction socket in maxilla promoted bone
655 regeneration in osteoporosis rat. *Life Sciences* 2022;290.
656 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119480>.
- 657 [53] Park CH, Abramson ZR, Taba M, Jin Q, Chang J, Kreider JM, et al. Three-
658 dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone
659 loss or repair. *J Periodontol* 2007;78:273–81. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060252>.
- 660 [54] Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu T-MG, Kowolik MJ, et al.
661 Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal
662 regeneration--a materials perspective. *Dent Mater* 2012;28:703–21.
663 <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.022>.
- 664 [55] Aprile P, Letourneur D, Simon-Yarza T. Membranes for Guided Bone Regeneration:
665 A Road from Bench to Bedside. *Adv Healthc Mater* 2020;9:e2000707.
666 <https://doi.org/10.1002/adhm.202000707>.
- 667 [56] Solomon S-M, Sufaru I-G, Teslaru S, Ghiciuc CM, Stafie CS. Finding the Perfect
668 Membrane: Current Knowledge on Barrier Membranes in Regenerative Procedures: A
669 Descriptive Review. *Applied Sciences* 2022;12:1042.
670 <https://doi.org/10.3390/app12031042>.
- 671 [57] Ford NL, Thornton MM, Holdsworth DW. Fundamental image quality limits for
672 microcomputed tomography in small animals. *Med Phys* 2003;30:2869–77.
673 <https://doi.org/10.1118/1.1617353>.

- 674 [58] Boone JM, Velazquez O, Cherry SR. Small-animal X-ray dose from micro-CT. *Mol*
675 *Imaging* 2004;3:149–58. <https://doi.org/10.1162/15353500200404118>.
- 676 [59] Kumar A, Sood A, Singhmar R, Mishra YK, Thakur VK, Han SS. Manufacturing
677 functional hydrogels for inducing angiogenic-osteogenic coupled progressions in hard
678 tissue repairs: prospects and challenges. *Biomater Sci* 2022;10:5472–97.
679 <https://doi.org/10.1039/d2bm00894g>.
- 680

5.3 Conclusion

L'élaboration d'un nouveau modèle pré-clinique pour l'évaluation de biomatériaux implantables en chirurgie orale a été présentée dans cette partie. Le suivi longitudinal de la cicatrisation par microscanner à intervalles de temps réguliers (*i.e.*, toutes les 2 semaines) a permis de déterminer la taille critique de ce défaut. L'accessibilité du maxillaire du fait de sa morphologie légèrement incurvée a rendu difficile la réalisation du défaut. Toutefois, l'utilisation d'un trépan osseux de petite taille (2,8 mm de diamètre) a facilité la reproduction de ce modèle expérimental. Quelle que soit la taille des défauts, ces derniers ont été considérés comme critiques puisqu'une régénération incomplète du défaut laissé vide a été observée en fin d'expérimentation (*i.e.*, 12 semaines post-opératoires).

La validation de ce nouveau modèle pré-clinique a été évaluée en mimant les procédures couramment utilisées en clinique, c'est-à-dire en comblant le défaut par un substitut osseux puis en le couvrant d'une membrane. Le substitut osseux employé ici étant « radiolucent » à T₀, sa progressive minéralisation a été suivie au cours du temps, permettant ainsi d'observer la complète régénération du défaut. Nous avons également comparé dans ce modèle animal deux membranes : l'une à base de collagène (Bio-Gide®) et l'autre à base de polysaccharides, le pullulane et le dextrane, et d'hydroxyapatite (Mb + HA). Lorsque le défaut était recouvert par Mb + HA, il a été possible de suivre le devenir de la membrane. Du fait de sa composition similaire à celle du GlycoBone®, la minéralisation progressive de cette membrane a également été observée. Contrairement à la membrane collagénique, Mb + HA n'était toujours pas dégradée 12 semaines après implantation, et sa structure est restée stable. Il est estimé qu'une membrane employée pour la ROG doit conserver son intégration dans les tissus jusqu'à 24 semaines après la chirurgie. Les résultats présentés ici sont encourageants quant à la stabilité de la membrane au cours du temps. Une évaluation à des temps plus longs (*e.g.*, 6 ou 12 mois) pourrait être envisagée pour analyser le devenir du matériau (stabilité, dégradation...).

L'analyse histologique des coupes transversales de maxillaire n'a pas pu être réalisée car les extrémités du défaut étaient difficiles à discerner du fait de la maturation du tissu osseux. En revanche, la minéralisation progressive de Mb + HA a permis de visualiser la position de cette membrane. Il a ainsi été observé un mauvais positionnement de la membrane pour recouvrir le défaut. (**Figure 41**). En pratique clinique, la stabilité de la membrane est assurée par sa suture ou par son maintien à l'aide de pin's. Afin d'assurer l'occlusivité du défaut osseux, les membranes implantées dans ce modèle pré-clinique devront être stabilisées.

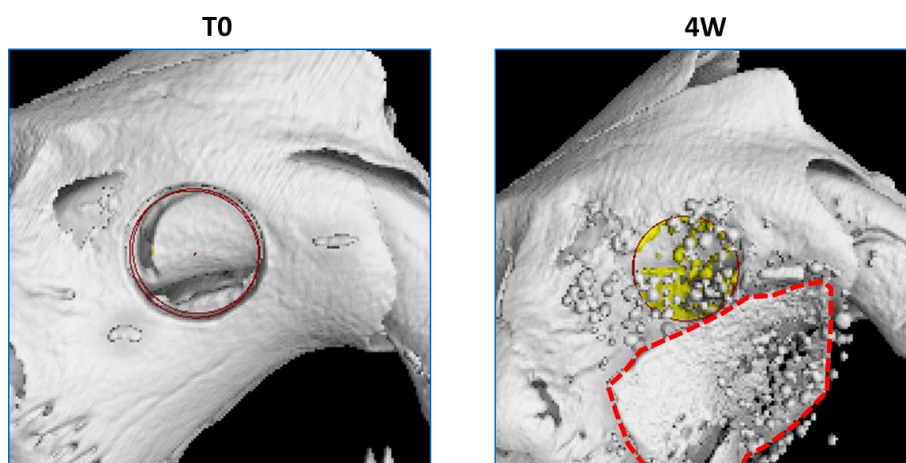


Figure 41 : Exemple d'un défaut où la membrane ne fait plus face au défaut. Les matériaux sont « radioluents » à T0 (ne sont donc pas visible au microscanner). A partir de 4 semaines après implantation, les matériaux se minéralisent progressivement et il est ainsi possible de visualiser leur disposition dans le défaut. Le cercle rouge représente la lésion initiale. A 4 semaines, la zone jaune représente le tissu néo-formé. Les pointillés rouges délimitent la membrane.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'utilisation d'une membrane produite à partir de substances naturelles (pullulane et dextrane) pour une application en régénération osseuse guidée a été évaluée lors de ces travaux de thèse.

Dans la première partie, les différentes formulations produites par l'entreprise SILTISS ont tout d'abord été caractérisées afin d'évaluer leur toxicité et leur potentiel rôle barrière en ROG. Leur implantation en sous-cutanée a mis en évidence l'apparition d'une capsule fibrotique qui s'amincit au court du temps. Toutefois, les analyses histologiques ont déterminé que ces formulations étaient biocompatibles. Le renforcement de la rigidité de la membrane polysaccharidique a été obtenue en l'associant avec des microparticules d'hydroxyapatite. Son implantation dans un défaut fémoral chez le rat a montré des résultats en faveur de la synthèse de tissus osseux pour des temps précoces, contrairement à la membrane collagénique commerciale.

Dans la seconde partie, la mise au point d'un modèle pré-clinique plus proche des pratiques cliniques a permis d'évaluer le potentiel intérêt de cette membrane pour la régénération osseuse guidée en chirurgie orale. L'utilisation du petit animal pour pré-sélectionner des formulations d'intérêt est une étape clé avant leur transfert vers un modèle de gros animal puis vers la clinique. Son association avec un substitut osseux de même composition a permis d'évaluer leur efficacité.

Plusieurs perspectives de travail peuvent être envisagées à l'issue de ces travaux :

1) L'optimisation des propriétés de la membrane polysaccharidique pour la régénération osseuse guidée

- Choix des composantes de la membrane :

Le développement de matériaux issus de substances naturelles représente un grand intérêt afin de s'affranchir de l'utilisation de substances d'origine animale pour des raisons éthiques ou religieuses. Dans cette optique, de nouveaux travaux cherchent à développer des membranes provenant de sources naturelles tels que le chitosane, l'alginate, la soie... Les membranes en chitosane restent malgré tout issues de crustacés et peuvent présenter un risque immunogénique en particulier pour les personnes allergiques.

Les premiers matériaux développés à base de pullulane et de dextrane étaient destinés à la chirurgie vasculaire [167,168]. Différentes concentrations de pullulane et de dextrane ont été proposées et leur biocompatibilité a été évaluée en sous-cutanée chez le rat [169]. Les résultats

les plus probants ont été obtenus pour un ratio pullulane/dextrane de 75:25. Plus tard, l'association de cette matrice polymérique à une phase inorganique (des particules d'hydroxyapatite) a montré un intérêt pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Le développement de microbilles injectables (GlycoBone®) a ainsi fait l'objet de nombreuses études pré-cliniques. Leur implantation chez l'homme sera prochainement étudiée pour une procédure d'augmentation de sinus (NCT05377710). En ingénierie tissulaire osseuse, l'élaboration de matériaux composites en combinant une phase polymérique avec des céramiques est souvent rapportée pour rendre le biomatériau ostéoconducteur. Afin d'améliorer les propriétés intrinsèques de l'hydroxyapatite, il est possible de doper ce cristal en substituant un ion Ca^{2+} par un ion Sr^{2+} . Les travaux de thèse de Camille EHRET portaient sur l'apport du strontium dans la phase minérale des matrices polysaccharidiques (GlycoBone®) [170,171]. Ses travaux ont démontré l'intérêt du dopage du strontium au sein de l'hydroxyapatite pour favoriser la réparation osseuse. Ainsi, l'association de la membrane polysaccharidique avec des particules d'hydroxyapatite dopées en strontium pourrait présenter un intérêt pour la régénération osseuse guidée.

- *Maniabilité :*

Les premiers prototypes de la membrane polysaccharidique reçus au laboratoire BioTis étaient seulement composés de la matrice polysaccharidique sans HA. Lors de leur réhydratation dans du sérum physiologique, les membranes se rétractaient compliquant alors leur manipulation. Cette rétraction était due à son procédé de fabrication mais aussi à l'impact de la stérilisation (aux rayons gamma) qui ont altéré les liaisons entre les chaînes polymériques. Le renforcement des membranes polysaccharidiques par l'ajout de polymères synthétiques ou naturels fait actuellement l'objet d'étude.

- *Dégradabilité :*

Les membranes résorbables sont le plus souvent utilisées en ROG pour éviter un second temps opératoire. L'implantation en sous-cutanée chez le rat nous a permis de démontrer la stabilité de ces membranes et ce, jusqu'à 16 semaines après implantation. Une étude plus approfondie sur la résorption du matériau devra être mise en œuvre pour étudier le devenir de la membrane à des temps plus longs (*e.g.*, 6 mois, 12 mois) en site osseux. Les seules données disponibles à ce jour concernent les microbilles en pullulane/dextrane. Leur implantation a été étudiée jusqu'à 6 mois dans un modèle d'augmentation de sinus chez le mouton [154]. Des traces résiduelles de microbilles étaient toujours présentes après 6 mois d'implantation. Il est également important

de noter l'impact de la porosité du matériau dans le processus de dégradation. Selon la taille de pores choisie, l'infiltration de cellules ostéogéniques sera plus ou moins facilitée, accélérant alors la dégradation du matériau.

2) Développement d'une membrane de troisième génération

Le développement de membranes dite « bio-actives » permet de conférer aux membranes des propriétés ostéo-inductrices en plus de leur rôle barrière. Différentes études s'intéressent au relargage de molécules actives (antibiotiques, facteurs de croissance...) par ces membranes. L'entreprise SILAB produit initialement des principes actifs pour la cosmétique. Deux molécules d'intérêt, nommées C1 et C2 pour des raisons de confidentialité, ont fait l'objet de brevets et s'avèrent être de potentiels candidats pour une application en médecine régénérative. Le composé C1 est produit à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec une fraction active polysaccharidique [172]. Ce dernier favorise la sécrétion de VEGF et promeut l'angiogenèse. Le composé C2 est extrait de l'arbuste *Helichrysum stoechas* avec une fraction active protéique [173]. Ce dernier favorise la sécrétion de périostine, une protéine impliquée dans le remodelage osseux et la réparation osseuse [174]. La combinaison de ces principes actifs avec la membrane permettrait ainsi de développer une membrane bioactive de troisième génération. Différents procédés d'imprégnation de ces principes actifs peuvent être envisagés en fonction de la diffusion souhaitée au niveau du site d'implantation. Ils peuvent soit : i) être incorporés *in situ* dans la solution polymérique avant le moulage de la membrane (**incorporation *in situ***) ou soit ii) être imprégnés par incubation sur la membrane lyophilisée (**incorporation par imprégnation**). Le relargage de ces molécules sera alors plus lent lorsqu'ils sont incorporés *in situ* ; ils seront relargués au moment de la dégradation de la membrane. Tandis que le relargage sera plus rapide s'ils sont adsorbés à la surface de la membrane par imprégnation. Ainsi, différents profils de relargages de ces substances peuvent être imaginés pour assurer la régénération du tissu lésé (**Figure 42**):

1. Un relargage multiple : les deux composés sont relargués simultanément à un instant t à des concentrations définies.
2. Un relargage spatio-temporel : un premier composé est relargué à un instant t et se poursuit durant le relargage du second composé à un instant $t+1$.
3. Un relargage séquentiel : un premier composé est relargué à un instant t , puis le second composé est relargué à la suite de ce premier composé.

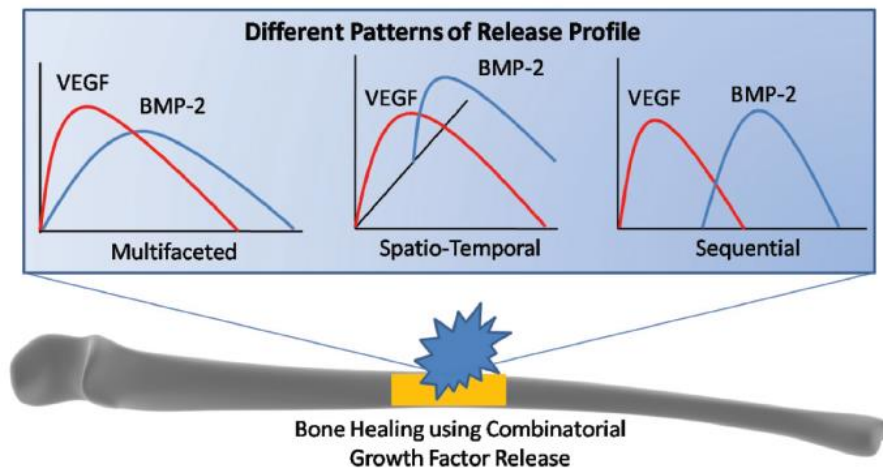


Figure 42 : Exemples de différents profils de relargages de molécules bioactives combinées [113].

Un relargage séquentiel des composés C1 et C2 pourrait être une piste intéressante à développer puisque C1 doit intervenir à des temps précoces en favorisant la sécrétion de VEGF, tandis que C2 doit intervenir à des temps plus longs en participant à la sécrétion de périostine. Actuellement, des études sont menées sur l'effet du composé C1 incorporé *in situ* dans les microbilles polysaccharidiques (GlycoBone®). *In vitro*, l'ajout de C1 sera étudié sur des cellules endothéliales issues du cordon ombilical (HUVECs) par l'analyse de la sécrétion de VEGF ainsi que l'expression de certains marqueurs vasculaires (CD31, VEGFR2, ANGI, ANGII). Une évaluation dans un modèle sous-cutané chez la souris sera également réalisée pour déterminer la meilleure incorporation du principe actif (*in situ* ou par imprégnation). Une étude en site orthotopique sera ensuite envisagée dans le modèle de défaut alvéolaire chez le rat pour déterminer son influence dans la régénération osseuse.

3) Utilisation de la membrane polysaccharidique pour la régénération de défaut segmentaire

Les membranes utilisées en régénération osseuse guidée peuvent également avoir un intérêt dans la technique de Masquelet. L'utilisation de telles membranes permettrait de réaliser cette technique en une unique procédure : l'ajout d'un substitut osseux dans le défaut qui serait supportée par la membrane. Les microbilles polysaccharidiques ont déjà fait l'objet d'études dans un défaut segmentaire réalisé chez le rat par la technique de la membrane induite [171]. L'association de ces microbilles avec la membrane polysaccharidique pourrait être menée pour observer leur potentiel de réparation osseuse.

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

Publications

Development of novel polysaccharide membranes for Guided Bone Regeneration: *In vitro* and *in vivo* evaluations

Ahmed Omar N, Roque J, Galvez P, Siadous R, Chassande O, Catros S, Amédée J, Roques S, Durand M, Bergeaut C, Bidault L, Aprile P, Letourneur D, Fricain J-C, Fenelon M

Bioengineering 2023 Nov ; XXX

Recent Advances of Pullulan and/or Dextran-Based Materials for Bone Tissue Engineering Strategies in Preclinical Studies: A Systematic Review

Ahmed Omar N, Amédée J, Letourneur D, Fricain J-C, Fenelon M

Front Bioeng Biotechnol 2022 Jun 30 ; 10 :889481. doi : 10.3389/fbioe.2022.889481

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

Touya N, Devun M, Handschin C, Casenave S, Ahmed Omar N, Gaubert A, Dusserre N, De Oliveira H, Kérourédan O, Devillard R

Biofabrication. 2022 Mar 9;14(2). doi: 10.1088/1758-5090/ac584b

Communications orales (congrès nationaux)

2021 Octobre	<p>Bone tissue engineering strategies using pullulan and/or dextran-based materials: a systematic review of pre-clinical studies. <u>Ahmed Omar N</u>, Amédée J, Siadous R, Bidault L, Letourneur D, Fricain JC Fenelon M</p> <p>BIOMAT, Bourg-Saint-Maurice (France)</p>
2022 Novembre	<p>Characterization of polysaccharidic membranes applied for guided bone regeneration by <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> analysis. <u>Ahmed Omar N</u>, Galvez P, Chassande O, Catros S, Amédée J, Roque S, Durand M, Bidault L, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Journée du Département Sciences et Technologies pour la Santé (STS), Pessac (France)</p>
2023 Mars	<p>Développement de dispositifs médicaux angiogéniques et ostéogéniques pour traiter des pertes de substances osseuses en chirurgies orale et orthopédique. <u>Ahmed Omar N</u>, Galvez P, Chassande O, Catros S, Amédée J, Roque S, Durand M, Bidault L, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Journée Thématique de l'ESS, Bordeaux (France)</p>

Communications affichées (congrès internationaux et nationaux)

<p>2021 Octobre</p>	<p>Bone tissue engineering strategies using pullulan and/or dextran-based materials: a systematic review of pre-clinical studies. <u>Ahmed Omar N</u>, Amédée J, Siadous R, Bidault L, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Journée du Département STS, Pessac (France)</p>
<p>2022 Avril</p>	<p>Alveolar bone defect in rat's maxillary: a new model to study implantable devices? <u>Ahmed Omar N</u>, Chassande O, Bidault L, Amédée J, Catros S, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Journée de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé</p>
<p>2022 Mai</p>	<p>Alveolar bone defect in rat's maxillary: a new model to study implantable devices? <u>Ahmed Omar N</u>, Chassande O, Bidault L, Amédée J, Catros S, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Bone tissue engineering strategies using pullulan and/or dextran-based materials: a systematic review of pre-clinical studies. <u>Ahmed Omar N</u>, Amédée J, Siadous R, Bidault L, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), La Baule (France)</p>
<p>2022 Juin</p>	<p>Alveolar bone defect in rat's maxillary: a new model to study implantable devices? <u>Ahmed Omar N</u>, Chassande O, Bidault L, Amédée J, Catros S, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Bone tissue engineering strategies using pullulan and/or dextran-based materials: a systematic review of pre-clinical studies. <u>Ahmed Omar N</u>, Amédée J, Siadous R, Bidault L, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Société Française de Chirurgie Orale (SFCO), Aix-Les-Bains (France)</p>
<p>2022 Septembre</p>	<p>Alveolar bone defect in rat's maxillary: a new model to study implantable devices? <u>Ahmed Omar N</u>, Chassande O, Bidault L, Amédée J, Catros S, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Bone tissue engineering strategies using pullulan and/or dextran-based materials: a systematic review of pre-clinical studies. <u>Ahmed Omar N</u>, Amédée J, Siadous R, Bidault L, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p>

	<p>Development of a new decellularized and lyophilized human amnio-chorionic membrane for bone regeneration. Galvez P, <u>Ahmed Omar N</u>, Siadous R, Roques S, Durand M, Lafarge X, Gindraux F, Sentilhes L, L'Heureux N, Fricain JC, Fénelon M</p> <p>European Society of Biomaterials (ESB), Bordeaux (France)</p>
2023 Mai	<p>Development of two novel polysaccharidic membranes for guided bone regeneration: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies. <u>Ahmed Omar N</u>, Galvez P, Roque J, Siadous R, Chassande O, Catros C, Amédée J, Roque S, Durand M, Bergeaut C, Bidault L, Aprile P, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Development of a new decellularized and lyophilized human amnio-chorionic membrane for bone regeneration. Galvez P, <u>Ahmed Omar N</u>, Siadous R, Roques S, Durand M, Lafarge X, Gindraux F, Sentilhes L, L'Heureux N, Fricain JC, Fénelon M</p> <p>JFBTM, Sète (France)</p>
2023 Juin	<p>Development of two novel polysaccharidic membranes for guided bone regeneration: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies. <u>Ahmed Omar N</u>, Galvez P, Roque J, Siadous R, Chassande O, Catros C, Amédée J, Roque S, Durand M, Bergeaut C, Bidault L, Aprile P, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Summer school Swiss-French Biomaterials (SFB), Zürich (Suisse)</p>
2023 Septembre	<p>Development of two novel polysaccharidic membranes for guided bone regeneration: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies. <u>Ahmed Omar N</u>, Galvez P, Roque J, Siadous R, Chassande O, Catros C, Amédée J, Roque S, Durand M, Bergeaut C, Bidault L, Aprile P, Letourneur D, Fricain JC, Fenelon M</p> <p>Development of a new decellularized and lyophilized human amnio-chorionic membrane for bone regeneration. Galvez P, <u>Ahmed Omar N</u>, Siadous R, Roques S, Durand M, Lafarge X, Gindraux F, Sentilhes L, L'Heureux N, Fricain JC, Fénelon M</p> <p>ESB, Davos (Suisse)</p>

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Boutault F. Reconstruction chirurgicale des pertes de substance des maxillaires n.d.
- [2] Abtahi S, Chen X, Shahabi S, Nasiri N. Resorbable Membranes for Guided Bone Regeneration: Critical Features, Potentials, and Limitations. *ACS Mater Au* 2023. <https://doi.org/10.1021/acsmaterialsau.3c00013>.
- [3] Hassanein M, Anderson JA. Refusal of animal-derived medical products in a paediatric setting: Ethical issues. *Paediatr Child Health* 2020;26:99–102. <https://doi.org/10.1093/pch/pxz171>.
- [4] Murray G, Holden R, Roschlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg* 1957;93:385–7. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(57\)90827-9](https://doi.org/10.1016/0002-9610(57)90827-9).
- [5] Linghorne WJ. The sequence of events in osteogenesis as studied in polyethylene tubes. *Ann N Y Acad Sci* 1960;85:445–60. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb49973.x>.
- [6] Melcher AH, Dreyer CJ. Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects 1962.
- [7] Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976;47:256–60. <https://doi.org/10.1902/jop.1976.47.5.256>.
- [8] Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982;9:257–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1982.tb02065.x>.
- [9] Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11:494–503. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1984.tb00901.x>.
- [10] Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:672–6. <https://doi.org/10.1097/00006534-198805000-00004>.
- [11] Nyman S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* 1991;18:494–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1991.tb02322.x>.
- [12] Nyman S, Lang NP, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5:9–14.
- [13] Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:735–42.
- [14] Lundgren D, Slotte C. Reconstruction of anatomically complicated periodontal defects using a bioresorbable GTR barrier supported by bone mineral. A 6-month follow-up study of 6 cases. *J Clin Periodontol* 1999;26:56–62. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.1999.260110.x>.
- [15] Bouchard P. *Parodontologie & dentisterie implantaire - Volume 2: Thérapeutiques chirurgicales (Coll. Dentaire)*. Lavoisier; 2015.
- [16] Shrivats AR, Alvarez P, Schutte L, Hollinger JO. Chapter 55 - Bone Regeneration. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, editors. *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, Boston: Academic Press; 2014, p. 1201–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00055-0>.
- [17] Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater* 2017;2:224–47. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.

- [18] Stewart S, Bryant SJ, Ahn J, Hankenson KD. Chapter 24 - Bone Regeneration. In: Atala A, Allickson JG, editors. *Translational Regenerative Medicine*, Boston: Academic Press; 2015, p. 313–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00024-4>.
- [19] Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res* 2019;37:35–50. <https://doi.org/10.1002/jor.24170>.
- [20] Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11:45–54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>.
- [21] Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969;27:309–18. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(69\)90357-0](https://doi.org/10.1016/0030-4220(69)90357-0).
- [22] Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials* 2018;185:240–75. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.028>.
- [23] Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:567–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x>.
- [24] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 2011;9:66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>.
- [25] Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen P. Barrier membranes: More than the barrier effect? *J Clin Periodontol* 2019;46 Suppl 21:103–23. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13068>.
- [26] Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules* 2021;26:3007. <https://doi.org/10.3390/molecules26103007>.
- [27] Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *Journal of Prosthodontic Research* 2013;57:3–14. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2012.12.001>.
- [28] Wang H-L, Boyapati L. “PASS” principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent* 2006;15:8–17. <https://doi.org/10.1097/01.id.0000204762.39826.0f>.
- [29] Patil S, Bhandi S, Bakri MMH, Albar DH, Alzahrani KJ, Al-Ghamdi MS, et al. Evaluation of efficacy of non-resorbable membranes compared to resorbable membranes in patients undergoing guided bone regeneration. *Heliyon* 2023;9:e13488. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13488>.
- [30] Farag MM. Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications: review. *J Mater Sci* 2023;58:527–58. <https://doi.org/10.1007/s10853-022-08102-x>.
- [31] Sam G, Pillai BRM. Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration-"Are the third Generation Membranes really here?". *J Clin Diagn Res* 2014;8:ZE14-17. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9957.5272>.
- [32] Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol* 2019;46 Suppl 21:82–91. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13123>.
- [33] Desnica J, Vujovic S, Stanisic D, Ognjanovic I, Jovicic B, Stevanovic M, et al. Preclinical Evaluation of Bioactive Scaffolds for the Treatment of Mandibular Critical-Sized Bone Defects: A Systematic Review. *Applied Sciences* 2023;13:4668. <https://doi.org/10.3390/app13084668>.

- [34] Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int* 2017;48:131–47. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a37133>.
- [35] Abdo VL, Suarez LJ, de Paula LG, Costa RC, Shibli J, Feres M, et al. Underestimated microbial infection of resorbable membranes on guided regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2023;226:113318. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113318>.
- [36] Seibert J, Nyman S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *J Periodontol* 1990;61:157–65. <https://doi.org/10.1902/jop.1990.61.3.157>.
- [37] Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J* 2014;8:56–65. <https://doi.org/10.2174/1874210601408010056>.
- [38] Sasaki J-I, Abe GL, Li A, Thongthai P, Tsuboi R, Kohno T, et al. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry. *Biomater Investig Dent* 2021;8:54–63. <https://doi.org/10.1080/26415275.2021.1925556>.
- [39] Ronda M, Rebaudi A, Torelli L, Stacchi C. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2014;25:859–66. <https://doi.org/10.1111/clr.12157>.
- [40] Li S, Zhao Y, Tian T, Zhang T, Xie Y, Cai X. A minimally invasive method for titanium mesh fixation with resorbable sutures in guided bone regeneration: A retrospective study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2023;25:87–98. <https://doi.org/10.1111/cid.13147>.
- [41] Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res* 2014;93:109–16. <https://doi.org/10.1177/0022034513506445>.
- [42] Duchamp de Lageneste O, Colnot C. Periostin in Bone Regeneration. *Adv Exp Med Biol* 2019;1132:49–61. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6657-4_6.
- [43] Zhang W, Wang N, Yang M, Sun T, Zhang J, Zhao Y, et al. Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration. *J Orthop Translat* 2022;33:41–54. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2022.01.002>.
- [44] Hasuike A, Ujiie H, Senoo M, Furuhata M, Kishida M, Akutagawa H, et al. Pedicle Periosteum as a Barrier for Guided Bone Regeneration in the Rabbit Frontal Bone. *In Vivo* 2019;33:717–22. <https://doi.org/10.21873/invivo.11530>.
- [45] Gallardo-Calero I, Barrera-Ochoa S, Manzanares MC, Sallent A, Vicente M, López-Fernández A, et al. Vascularized Periosteal Flaps Accelerate Osteointegration and Revascularization of Allografts in Rats. *Clin Orthop Relat Res* 2019;477:741–55. <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000000400>.
- [46] Li Q, Liu W, Hou W, Wu X, Wei W, Liu J, et al. Micropatterned photothermal double-layer periosteum with angiogenesis-neurogenesis coupling effect for bone regeneration. *Mater Today Bio* 2023;18:100536. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100536>.
- [47] Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:e37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>.
- [48] Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, Buffoli B, Labanca M, Scari G, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech* 2011;74:772–7. <https://doi.org/10.1002/jemt.20968>.
- [49] Agrawal AA. Platelet rich fibrin is not a barrier membrane! Or is it? *World J Clin Cases* 2023;11:2396–404. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i11.2396>.

- [50] Ferreira Sávio D de S, Silva LMP da, Reis GGD, Denardi RJ, Costa NMM da, Chaves Furlaneto FA, et al. Effects of platelet-rich fibrin produced by three centrifugation protocols on bone neof ormation in defects created in rat calvaria. *Platelets* 2023;34:2228417. <https://doi.org/10.1080/09537104.2023.2228417>.
- [51] Masquelet AC, Begue T. The Concept of Induced Membrane for Reconstruction of Long Bone Defects. *Orthopedic Clinics of North America* 2010;41:27–37. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2009.07.011>.
- [52] Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet* 2000;45:346–53.
- [53] Klein C, Monet M, Barbier V, Vanlaeys A, Masquelet A-C, Gouron R, et al. The Masquelet technique: Current concepts, animal models, and perspectives. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2020;14:1349–59. <https://doi.org/10.1002/term.3097>.
- [54] Alford AI, Nicolaou D, Hake M, McBride-Gagyi S. Masquelet’s induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *Journal of Orthopaedic Research* 2021;39:707–18. <https://doi.org/10.1002/jor.24978>.
- [55] Henrich D, Seebach C, Nau C, Basan S, Relja B, Wilhelm K, et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J Tissue Eng Regen Med* 2016;10:E382–96. <https://doi.org/10.1002/term.1826>.
- [56] Catros S, Zwetyenga N, Bareille R, Brouillaud B, Renard M, Amédée J, et al. Subcutaneous-induced membranes have no osteoinductive effect on macroporous HA-TCP in vivo. *J Orthop Res* 2009;27:155–61. <https://doi.org/10.1002/jor.20738>.
- [57] Fénelon M, Catros S, Meyer C, Fricain J-C, Obert L, Auber F, et al. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes (Basel)* 2021;11:387. <https://doi.org/10.3390/membranes11060387>.
- [58] Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101:375–86. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1994.tb11908.x>.
- [59] Shilo D, Shalev E. New Insights on the Biomechanics of the Fetal Membrane. *Front Biosci (Schol Ed)* 2023;15:6. <https://doi.org/10.31083/j.fbs1502006>.
- [60] Alauddin MS, Abdul Hayei NA, Sabarudin MA, Mat Baharin NH. Barrier Membrane in Regenerative Therapy: A Narrative Review. *Membranes (Basel)* 2022;12:444. <https://doi.org/10.3390/membranes12050444>.
- [61] Fenelon M, Etchebarne M, Siadous R, Grémare A, Durand M, Sentilhes L, et al. Assessment of fresh and preserved amniotic membrane for guided bone regeneration in mice. *J Biomed Mater Res A* 2020;108:2044–56. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36964>.
- [62] Nemati M, Nowrouzi M, Nemati F, Alizadeh A. The improving effects of the amnion and chorion membranes on tissue regeneration in periodontal disorders: A systematic review. *Tissue Cell* 2023;83:102147. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102147>.
- [63] Bidault DP, Zakrzewski DA, Lacoste DE. Alloderm® : le point sur ce matériau en chirurgie muco-gingivale 2004;41.
- [64] Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu T-MG, Kowolik MJ, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dent Mater* 2012;28:703–21. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.022>.
- [65] Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynypas M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res* 2017;21:9. <https://doi.org/10.1186/s40824-017-0095-5>.

- [66] Ji Y, Zhou J, Sun T, Tang K, Xiong Z, Ren Z, et al. Diverse preparation methods for small intestinal submucosa (SIS): Decellularization, components, and structure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2019;107:689–97. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36582>.
- [67] Wu W, Li B, Liu Y, Wang X, Tang L. Effect of Multilaminar Small Intestinal Submucosa as a Barrier Membrane on Bone Formation in a Rabbit Mandible Defect Model. *BioMed Research International* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3270293>.
- [68] Cao G, Huang Y, Li K, Fan Y, Xie H, Li X. Small intestinal submucosa: superiority, limitations and solutions, and its potential to address bottlenecks in tissue repair. *J Mater Chem B* 2019;7:5038–55. <https://doi.org/10.1039/C9TB00530G>.
- [69] Aprile P, Letourneur D, Simon-Yarza T. Membranes for Guided Bone Regeneration: A Road from Bench to Bedside. *Adv Healthc Mater* 2020;9:e2000707. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000707>.
- [70] Ren Y, Fan L, Alkildani S, Liu L, Emmert S, Najman S, et al. Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR): A Focus on Recent Advances in Collagen Membranes. *Int J Mol Sci* 2022;23:14987. <https://doi.org/10.3390/ijms232314987>.
- [71] Solomon S-M, Sufaru I-G, Teslaru S, Ghiciuc CM, Stafie CS. Finding the Perfect Membrane: Current Knowledge on Barrier Membranes in Regenerative Procedures: A Descriptive Review. *Applied Sciences* 2022;12:1042. <https://doi.org/10.3390/app12031042>.
- [72] Radenković M, Alkildani S, Stoewe I, Bielenstein J, Sundag B, Bellmann O, et al. Comparative In Vivo Analysis of the Integration Behavior and Immune Response of Collagen-Based Dental Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes (Basel)* 2021;11:712. <https://doi.org/10.3390/membranes11090712>.
- [73] Reznikov N, Steele J a. M, Fratzl P, Stevens MM. A materials science vision of extracellular matrix mineralization. *Nat Rev Mater* 2016;1:1–14. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.41>.
- [74] Zhu M, Duan B, Hou K, Mao L, Wang X. A comparative in vitro and in vivo study of porcine- and bovine-derived non-cross-linked collagen membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2023;111:568–78. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35174>.
- [75] Jung N, Park J, Park S-H, Oh S, Kim S, Cho S-W, et al. Improving Bone Formation by Guided Bone Regeneration Using a Collagen Membrane with rhBMP-2: A Novel Concept. *Journal of Functional Biomaterials* 2023;14:170. <https://doi.org/10.3390/jfb14030170>.
- [76] Yamano S, Ty L, Dai J. Bioactive Collagen Membrane as a Carrier for Sustained Release of PDGF. *J Tissue Sci Eng* 2011;02. <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000110>.
- [77] Madni A, Kousar R, Naeem N, Wahid F. Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 2021;6:11–25. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.01.002>.
- [78] Teimoori M, Nokhbatolfoghahaei H, Khojasteh A. Bilayer scaffolds/membranes for bone tissue engineering applications: A systematic review. *Biomaterials Advances* 2023;153. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213528>.
- [79] Yang L, Lu W, Pang Y, Huang X, Wang Z, Qin A, et al. Fabrication of a novel chitosan scaffold with asymmetric structure for guided tissue regeneration. *RSC Adv* 2016;6:71567–73. <https://doi.org/10.1039/C6RA12370H>.
- [80] Miyahara T, Nyan M, Shimoda A, Yamamoto Y, Kuroda S, Shiota M, et al. Exploitation of a novel polysaccharide nanogel cross-linking membrane for guided bone regeneration (GBR). *J Tissue Eng Regen Med* 2012;6:666–72. <https://doi.org/10.1002/term.475>.

- [81] Yoo C-K, Jeon J-Y, Kim Y-J, Kim S-G, Hwang K-G. Cell attachment and proliferation of osteoblast-like MG63 cells on silk fibroin membrane for guided bone regeneration. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2016;38:17. <https://doi.org/10.1186/s40902-016-0062-4>.
- [82] Bunyaratavej P, Wang H-L. Collagen Membranes: A Review. *Journal of Periodontology* 2001;72:215–29. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.2.215>.
- [83] Lu S, Wang P, Zhang F, Zhou X, Zuo B, You X, et al. A novel silk fibroin nanofibrous membrane for guided bone regeneration: a study in rat calvarial defects. *Am J Transl Res* 2015;7:2244–53.
- [84] Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim H-J, Kim HS, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* 2008;29:3415–28. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.002>.
- [85] Wu DT, Munguia-Lopez JG, Cho YW, Ma X, Song V, Zhu Z, et al. Polymeric Scaffolds for Dental, Oral, and Craniofacial Regenerative Medicine. *Molecules* 2021;26:7043. <https://doi.org/10.3390/molecules26227043>.
- [86] Gottlow J, Laurell L, Lundgren D, Mathisen T, Nyman S, Rylander H, et al. Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue regeneration device: a longitudinal study in monkeys. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994;14:436–49.
- [87] Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, et al. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers (Basel)* 2016;8:115. <https://doi.org/10.3390/polym8040115>.
- [88] Hua N, Ti VL, Xu Y. Biodegradable Effect of PLGA Membrane in Alveolar Bone Regeneration on Beagle Dog. *Cell Biochem Biophys* 2014;70:1051–5. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0022-5>.
- [89] Xue Y, Zhu Z, Zhang X, Chen J, Yang X, Gao X, et al. Accelerated Bone Regeneration by MOF Modified Multifunctional Membranes through Enhancement of Osteogenic and Angiogenic Performance. *Advanced Healthcare Materials* 2021;10:2001369. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001369>.
- [90] Wang F, Xia D, Wang S, Gu R, Yang F, Zhao X, et al. Photocrosslinkable Col/PCL/Mg composite membrane providing spatiotemporal maintenance and positive osteogenetic effects during guided bone regeneration. *Bioactive Materials* 2022;13:53–63. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.019>.
- [91] Joo G, Park M, Park S, Tripathi G, Lee B-T. Tailored alginate/PCL-gelatin- β -TCP membrane for guided bone regeneration. *Biomed Mater* 2022;17:045011. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac6bd8>.
- [92] Qian S, Zhao B, Mao J, Liu Z, Zhao Q, Lu B, et al. Biomedical applications of Janus membrane. *Biomedical Technology* 2023;2:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.bmt.2022.11.003>.
- [93] Lai C, Cheng M, Ning C, He Y, Zhou Z, Yin Z, et al. Janus electro-microenvironment membrane with surface-selective osteogenesis/gingival healing ability for guided bone regeneration. *Materials Today Bio* 2022;17:100491. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100491>.
- [94] Blašković M, Butorac Prpić I, Blašković D, Rider P, Tomas M, Čandrlić S, et al. Guided Bone Regeneration Using a Novel Magnesium Membrane: A Literature Review and a Report of Two Cases in Humans. *Journal of Functional Biomaterials* 2023;14:307. <https://doi.org/10.3390/jfb14060307>.
- [95] Wu S, Jang Y-S, Kim Y-K, Kim S-Y, Ko S-O, Lee M-H. Surface Modification of Pure Magnesium Mesh for Guided Bone Regeneration: In Vivo Evaluation of Rat Calvarial Defect. *Materials (Basel)* 2019;12:2684. <https://doi.org/10.3390/ma12172684>.

- [96] Shan X, Xu Y, Kolawole SK, Wen L, Qi Z, Xu W, et al. Degradable Pure Magnesium Used as a Barrier Film for Oral Bone Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials* 2022;13:298. <https://doi.org/10.3390/jfb13040298>.
- [97] Chen K, Zhao L, Huang C, Yin X, Zhang X, Li P, et al. Recent Advances in the Development of Magnesium-Based Alloy Guided Bone Regeneration (GBR) Membrane. *Metals* 2022;12:2074. <https://doi.org/10.3390/met12122074>.
- [98] Elad A, Rider P, Rogge S, Witte F, Tadić D, Kačarević ŽP, et al. Application of Biodegradable Magnesium Membrane Shield Technique for Immediate Dentoalveolar Bone Regeneration. *Biomedicines* 2023;11:744. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030744>.
- [99] Évaluation des substituts osseux. Haute Autorité de Santé n.d. https://www.has-sante.fr/jcms/c_1225008/fr/evaluation-des-substituts-osseux (accessed August 31, 2023).
- [100] Jordana F, Visage CL, Weiss P. Substituts osseux. *Med Sci (Paris)* 2017;33:60–5. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301010>.
- [101] Chai F, Raoul G, Wiss A, Ferri J, Hildebrand HF. Les biomatériaux de substitution osseuse : classification et intérêt. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale* 2011;112:212–21. <https://doi.org/10.1016/j.stomax.2011.06.003>.
- [102] Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 2006;3:49–57. <https://doi.org/10.1586/17434440.3.1.49>.
- [103] Lee SS, Du X, Kim I, Ferguson SJ. Scaffolds for bone-tissue engineering. *Matter* 2022;5:2722–59. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.003>.
- [104] Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V. Les substituts osseux en odontologie. *L'Information Dentaire* 2021. <https://www.information-dentaire.fr/formations/les-substituts-osseux-en-odontologie/> (accessed October 17, 2023).
- [105] Ana ID, Satria GAP, Dewi AH, Ardhani R. Bioceramics for Clinical Application in Regenerative Dentistry. *Adv Exp Med Biol* 2018;1077:309–16. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_16.
- [106] Mainard D, Netter P. Place des substituts de l'os dans les pertes de substances osseuses. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 2018;202:1179–200. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30282-1](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30282-1).
- [107] Rey C. Du minéral osseux aux biomatériaux, un biominéral particulier : l'apatite. *Société Chimique de France (SCF)* n.d. <https://new.societechimiquedefrance.fr/numero/du-mineral-osseux-aux-biomateriaux-un-biomineral-particulier-lapatite-p41-n192/> (accessed August 31, 2023).
- [108] Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials (Basel)* 2009;2:399–498. <https://doi.org/10.3390/ma2020399>.
- [109] Wang B, Zhang Z, Pan H. Bone Apatite Nanocrystal: Crystalline Structure, Chemical Composition, and Architecture. *Biomimetics (Basel)* 2023;8:90. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8010090>.
- [110] Budharaju H, Suresh S, Sekar MP, De Vega B, Sethuraman S, Sundaramurthi D, et al. Ceramic materials for 3D printing of biomimetic bone scaffolds – Current state-of-the-art & future perspectives. *Materials and Design* 2023;231. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.112064>.
- [111] Liu D, Cui C, Chen W, Shi J, Li B, Chen S. Biodegradable Cements for Bone Regeneration. *J Funct Biomater* 2023;14:134. <https://doi.org/10.3390/jfb14030134>.
- [112] Georgeanu VA, Gingu O, Antoniac IV, Manolea HO. Current Options and Future Perspectives on Bone Graft and Biomaterials Substitutes for Bone Repair, from Clinical Needs to Advanced Biomaterials Research. *Applied Sciences* 2023;13:8471. <https://doi.org/10.3390/app13148471>.

- [113] Kim HD, Amirthalingam S, Kim SL, Lee SS, Rangasamy J, Hwang NS. Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater* 2017;6. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700612>.
- [114] Dash PA, Mohanty S, Nayak SK. A review on bioactive glass, its modifications and applications in healthcare sectors. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2023;614:122404. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122404>.
- [115] Shearer A, Montazerian M, Sly JJ, Hill RG, Mauro JC. Trends and perspectives on the commercialization of bioactive glasses. *Acta Biomaterialia* 2023;160:14–31. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.02.020>.
- [116] Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757–74. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- [117] Negut I, Ristoscu C. Bioactive Glasses for Soft and Hard Tissue Healing Applications—A Short Review. *Applied Sciences* 2023;13:6151. <https://doi.org/10.3390/app13106151>.
- [118] Jiang N, Qin C-H, Ma Y-F, Wang L, Yu B. Possibility of one-stage surgery to reconstruct bone defects using the modified Masquelet technique with degradable calcium sulfate as a cement spacer: A case report and hypothesis. *Biomed Rep* 2016;4:374–8. <https://doi.org/10.3892/br.2016.584>.
- [119] Alvarez Echazú MI, Perna O, Olivetti CE, Antezana PE, Municoy S, Tuttolomondo MV, et al. Recent Advances in Synthetic and Natural Biomaterials-Based Therapy for Bone Defects. *Macromol Biosci* 2022;22:e2100383. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100383>.
- [120] Javid-Naderi MJ, Behravan J, Karimi-Hajishohreh N, Toosi S. Synthetic polymers as bone engineering scaffold. *Polymers for Advanced Technologies* 2023;34:2083–96. <https://doi.org/10.1002/pat.6046>.
- [121] Alavi MS, Memarpour S, Pazhohan-Nezhad H, Salimi Asl A, Moghbeli M, Shadmanfar S, et al. Applications of poly(lactic acid) in bone tissue engineering: A review article. *Artif Organs* 2023. <https://doi.org/10.1111/aor.14612>.
- [122] Guduric V, Siadous R, Babilotte J, Seimille M, Bareille R, Rey S, et al. Layer-by-layer bioassembly of poly(lactic) acid membranes loaded with coculture of HBMSCs and EPCs improves vascularization in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2019;107:2629–42. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36769>.
- [123] Ye B, Wu B, Su Y, Sun T, Guo X. Recent Advances in the Application of Natural and Synthetic Polymer-Based Scaffolds in Musculoskeletal Regeneration. *Polymers* 2022;14:4566. <https://doi.org/10.3390/polym14214566>.
- [124] Wong SK, Yee MMF, Chin K-Y, Ima-Nirwana S. A Review of the Application of Natural and Synthetic Scaffolds in Bone Regeneration. *J Funct Biomater* 2023;14:286. <https://doi.org/10.3390/jfb14050286>.
- [125] Babilotte J, Martin B, Guduric V, Bareille R, Agniel R, Roques S, et al. Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;118:111334. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111334>.
- [126] Al-Shalawi FD, Mohamed Ariff AH, Jung D-W, Mohd Ariffin MKA, Seng Kim CL, Brabazon D, et al. Biomaterials as Implants in the Orthopedic Field for Regenerative Medicine: Metal versus Synthetic Polymers. *Polymers (Basel)* 2023;15:2601. <https://doi.org/10.3390/polym15122601>.
- [127] Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020;110:110698. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110698>.
- [128] Wang Y, Wang J, Gao R, Liu X, Feng Z, Zhang C, et al. Biomimetic glycopeptide hydrogel coated PCL/nHA scaffold for enhanced cranial bone regeneration via

- macrophage M2 polarization-induced osteo-immunomodulation. *Biomaterials* 2022;285:121538. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121538>.
- [129] Huang X, Wang Z, Wang H, Chen D, Tong L. Novel strategies for the treatment of osteoarthritis based on biomaterials and critical molecular signaling. *Journal of Materials Science & Technology* 2023;149:42–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2022.11.027>.
- [130] Sun S, Cui Y, Yuan B, Dou M, Wang G, Xu H, et al. Drug delivery systems based on polyethylene glycol hydrogels for enhanced bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 2023;11:1117647. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1117647>.
- [131] Catros S, Molenberg A, Freilich M, Dard M. Evaluation of a Polyethylene Glycol-Osteogenic Protein-1 System on Alveolar Bone Regeneration in the Mini-Pig. *J Oral Implantol* 2015;41:e96–101. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-13-00307>.
- [132] Sun S, Cui Y, Yuan B, Dou M, Wang G, Xu H, et al. Drug delivery systems based on polyethylene glycol hydrogels for enhanced bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 2023;11:1117647. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1117647>.
- [133] Cheng R, Xin T, Liu L, Wang F, Ye T, Deng L, et al. A “three-in-one” injectable hydrogel platform with osteogenesis, angiogenesis and antibacterial for guiding bone regeneration. *Applied Materials Today* 2020;20:100763. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100763>.
- [134] Guillén-Carvajal K, Valdez-Salas B, Beltrán-Partida E, Salomón-Carlos J, Cheng N. Chitosan, Gelatin, and Collagen Hydrogels for Bone Regeneration. *Polymers (Basel)* 2023;15:2762. <https://doi.org/10.3390/polym15132762>.
- [135] Ilić-Stojanović S, Nikolić L, Cakić S. A Review of Patents and Innovative Biopolymer-Based Hydrogels. *Gels* 2023;9:556. <https://doi.org/10.3390/gels9070556>.
- [136] Yao S, Shang Y, Ren B, Deng S, Wang Z, Peng Y, et al. A novel natural-derived tilapia skin collagen mineralized with hydroxyapatite as a potential bone-grafting scaffold. *J Biomater Appl* 2022;37:219–37. <https://doi.org/10.1177/08853282221086246>.
- [137] Andrezza R, Morales A, Pieniz S, Labidi J. Gelatin-Based Hydrogels: Potential Biomaterials for Remediation. *Polymers (Basel)* 2023;15:1026. <https://doi.org/10.3390/polym15041026>.
- [138] Fan Y, Ren G, Cui Y, Liu H, Li S, Tian Y, et al. Peptide-based hydrogel for enhanced bone repair. *Materials & Design* 2023;229:111862. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.111862>.
- [139] Dec P, Modrzejewski A, Pawlik A. Existing and Novel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* 2023;24. <https://doi.org/10.3390/ijms24010529>.
- [140] Zhang Y, Sun T, Jiang C. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharm Sin B* 2018;8:34–50. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.11.005>.
- [141] Asakura T, Williamson MP. A review on the structure of Bombyx mori silk fibroin fiber studied using solid-state NMR: An antipolar lamella with an 8-residue repeat. *Int J Biol Macromol* 2023;245:125537. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125537>.
- [142] Hussain A, Zia KM, Tabasum S, Noreen A, Ali M, Iqbal R, et al. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *Int J Biol Macromol* 2017;94:10–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>.
- [143] Janmohammadi M, Nazemi Z, Salehi AOM, Seyfoori A, John JV, Nourbakhsh MS, et al. Cellulose-based composite scaffolds for bone tissue engineering and localized drug delivery. *Bioact Mater* 2023;20:137–63. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.05.018>.

- [144] Jin M, Shi J, Zhu W, Yao H, Wang D-A. Polysaccharide-Based Biomaterials in Tissue Engineering: A Review. *Tissue Eng Part B Rev* 2021;27:604–26. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2020.0208>.
- [145] Sivakumar PM, Yetisgin AA, Demir E, Sahin SB, Cetinel S. Polysaccharide-bioceramic composites for bone tissue engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 2023;250. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126237>.
- [146] Pramanik S, Kharche S, More N, Ranglani D, Singh G, Kapusetti G. Natural Biopolymers for Bone Tissue Engineering: A Brief Review. *Engineered Regeneration* 2023;4:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.12.002>.
- [147] Mahmoud YA-G, El-Naggar ME, Abdel-Megeed A, El-Newehy M. Recent Advancements in Microbial Polysaccharides: Synthesis and Applications. *Polymers* 2021;13:4136. <https://doi.org/10.3390/polym13234136>.
- [148] Freitas F, Alves VD, Reis MAM. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol* 2011;29:388–98. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>.
- [149] Carvalho LT, Vieira TA, Zhao Y, Celli A, Medeiros SF, Lacerda TM. Recent advances in the production of biomedical systems based on polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides. *Int J Biol Macromol* 2021;183:1514–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.025>.
- [150] Prajapati VD, Jani GK, Khanda SM. Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydr Polym* 2013;95:540–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.082>.
- [151] Moscovici M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol* 2015;6:1012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012>.
- [152] Alqahtani AM. Guided Tissue and Bone Regeneration Membranes: A Review of Biomaterials and Techniques for Periodontal Treatments. *Polymers* 2023;15:3355. <https://doi.org/10.3390/polym15163355>.
- [153] Schlaubitz S, Derkaoui SM, Marosa L, Miraux S, Renard M, Catros S, et al. Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle defect in rats. *PLoS ONE* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110251>.
- [154] Fricain JC, Aid R, Lanouar S, Maurel DB, Le Nihouannen D, Delmond S, et al. In-vitro and in-vivo design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dent Mater* 2018;34:1024–35. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>.
- [155] Maurel DB, Fénelon M, Aid-Launais R, Bidault L, Le Nir A, Renard M, et al. Bone regeneration in both small and large preclinical bone defect models using an injectable polymer-based substitute containing hydroxyapatite and reconstituted with saline or autologous blood. *J Biomed Mater Res A* 2021. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37176>.
- [156] Ielo I, Calabrese G, De Luca G, Conoci S. Recent Advances in Hydroxyapatite-Based Biocomposites for Bone Tissue Regeneration in Orthopedics. *Int J Mol Sci* 2022;23:9721. <https://doi.org/10.3390/ijms23179721>.
- [157] Mouriño V, Cattalini JP, Boccaccini AR. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. *J R Soc Interface* 2012;9:401–19. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0611>.
- [158] Qin Q, Liu Y, Yang Z, Aimaijiang M, Ma R, Yang Y, et al. Hypoxia-Inducible Factors Signaling in Osteogenesis and Skeletal Repair. *Int J Mol Sci* 2022;23:11201. <https://doi.org/10.3390/ijms231911201>.
- [159] Sheng X, Li C, Wang Z, Xu Y, Sun Y, Zhang W, et al. Advanced applications of strontium-containing biomaterials in bone tissue engineering. *Materials Today Bio* 2023;20. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100636>.

- [160] Kowalczewski CJ, Saul JM. Biomaterials for the Delivery of Growth Factors and Other Therapeutic Agents in Tissue Engineering Approaches to Bone Regeneration. *Front Pharmacol* 2018;9:513. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00513>.
- [161] Safari B, Davaran S, Aghanejad A. Osteogenic potential of the growth factors and bioactive molecules in bone regeneration. *Int J Biol Macromol* 2021;175:544–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.052>.
- [162] Shineh G, Patel K, Mobaraki M, Tayebi L. Functional Approaches in Promoting Vascularization and Angiogenesis in Bone Critical-Sized Defects via Delivery of Cells, Growth Factors, Drugs, and Particles. *J Funct Biomater* 2023;14:99. <https://doi.org/10.3390/jfb14020099>.
- [163] Tsiklin IL, Shabunin AV, Kolsanov AV, Volova LT. In Vivo Bone Tissue Engineering Strategies: Advances and Prospects. *Polymers (Basel)* 2022;14:3222. <https://doi.org/10.3390/polym14153222>.
- [164] Xu Z, Kusumbe AP, Cai H, Wan Q, Chen J. Type H blood vessels in coupling angiogenesis-osteogenesis and its application in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2023;111:1434–46. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35243>.
- [165] Maldonado VV, Patel NH, Smith EE, Barnes CL, Gustafson MP, Rao RR, et al. Clinical utility of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine and cellular therapy. *Journal of Biological Engineering* 2023;17. <https://doi.org/10.1186/s13036-023-00361-9>.
- [166] Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012;40:363–408.
- [167] Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* 2006;27:5546–53. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.032>.
- [168] Thébaud N-B, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: A prerequisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med* 2007;18:339–45. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0698-1>.
- [169] Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P, Louedec L, et al. Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2011;96:535–42. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33007>.
- [170] Ehret C, Aid-Launais R, Sagardoy T, Siadous R, Bareille R, Rey S, et al. Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation. *PLoS One* 2017;12:e0184663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184663>.
- [171] Ehret C, Aid R, Dos Santos BP, Rey S, Letourneur D, Amédée Vilamitjana J, et al. Bone Regeneration in Small and Large Segmental Bone Defect Models after Radiotherapy Using Injectable Polymer-Based Biodegradable Materials Containing Strontium-Doped Hydroxyapatite Particles. *Int J Mol Sci* 2023;24:5429. <https://doi.org/10.3390/ijms24065429>.
- [172] Paufique JJ. Procédé d'obtention d'un principe actif à partir de levures permettant de lutter contre l'altération du contour des yeux. FR2851576A1, 2004.
- [173] Paufique J. Principe actif cosmétique issu d'hélichrysum stoechas et utilisation pour lutter contre le vieillissement de la peau. FR3040625A1, 2017.
- [174] Kii I. Periostin Functions as a Scaffold for Assembly of Extracellular Proteins. *Adv Exp Med Biol* 2019;1132:23–32. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6657-4_3.