



HAL
open science

Reconstruction du cartilage nasal par impression 3D et ingénierie tissulaire : le projet NASALTIS

Delphine Vertu-Ciolino

► **To cite this version:**

Delphine Vertu-Ciolino. Reconstruction du cartilage nasal par impression 3D et ingénierie tissulaire : le projet NASALTIS. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10153 . tel-04924809

HAL Id: tel-04924809

<https://theses.hal.science/tel-04924809v1>

Submitted on 1 Feb 2025

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 de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

École Doctorale ED 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Discipline : Biologie cellulaire et ingénierie tissulaire

Soutenue publiquement le 09/12/2022, par :
Delphine VERTU-CIOLINO

Reconstruction du cartilage nasal par impression 3D et ingénierie tissulaire : le projet NASALTIS

Devant le jury composé de :

Pr FARGES Jean-Christophe	PU-PH	Université Lyon 1	Président du jury
Dr DEMOOR Magali	MC	Université de Caen	Rapporteuse
Dr LOGEART-AVRAMOGLIOU Delphine	DR	CNRS Paris	Rapporteuse
Dr PERRIER-GROULT Émeline	CR	CNRS Montpellier	Examinatrice
Dr MALLEIN-GERIN Frédéric	DR	CNRS Lyon	Examineur & Directeur de thèse
Dr MALCOR Jean-Daniel	CR	CNRS Lyon	Examineur & Co-directeur de thèse
Dr MARQUETTE Christophe	DR	CNRS Lyon	Invité

*Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique
UMR 5305*

Équipe ROAD Recherche en Ostéo-Articulaire et Dentaire

Institut de Biologie et Chimie des Protéines

*7 passage du Vercors
69367 Lyon Cedex 07*

Résumé en français

Reconstruction du cartilage nasal par impression 3D et ingénierie tissulaire : le projet NASALTIS

Le projet repose sur l'association de trois équipes qui ont mis en commun leur expertise pour permettre ce travail interdisciplinaire associant la biologie cellulaire, l'impression 3D, et des compétences chirurgicales. La chirurgie reconstructrice du nez se heurte souvent au manque de cartilage. Le cartilage de la cloison nasale est la pièce maîtresse du nez. Son rôle est à la fois morphologique pour donner la forme projetée spécifique du nez humain, et fonctionnel pour maintenir perméable les fosses nasales au moment de l'inspiration. Ainsi la cloison nasale a un rôle à la fois morphologique et fonctionnel majeur. Malheureusement, le nez est un organe exposé au traumatisme ou aux pertes de substance en cas d'exérèse de tumeur maligne. De plus, le cartilage est un tissu avasculaire, ce qui entraîne une absence de capacités de régénération. La reconstruction du nez doit donc faire appel à des greffons de cartilage autologue prélevés au niveau du cartilage de l'oreille ou du cartilage des côtes, au prix d'une morbidité du site donneur pour le patient. Des implants alloplastiques existent, mais présentent un risque très élevé de surinfection et de rejet. C'est pourquoi les chirurgiens se tournent aujourd'hui vers l'ingénierie tissulaire pour éviter ces écueils. Les propriétés mécaniques du cartilage sont très importantes et doivent être imitées par le tissu construit en ingénierie tissulaire. Nous avons imaginé un concept de prothèse de cloison nasale associant un support structurel fabriqué dans un matériau de grade médical, de structure poreuse, imprimable en 3D, recouvert d'un gel de fibrine chargé de chondrocytes nasaux humains, pour répondre aux enjeux mécaniques et améliorer l'immunotolérance du tissu construit. Les chondrocytes nasaux humains sont obtenus par dons de résidus opératoires auprès de patients ayant donné leur consentement. L'amplification des chondrocytes, puis leur culture en hydrogel de fibrine, ont été réalisés en utilisant des facteurs solubles chondrogéniques, selon un protocole qui avait déjà montré son efficacité sur des chondrocytes nasaux et articulaires, au contact de différents supports liquides ou solides. Deux matériaux-candidats ont été évalués, en testant leur imprimabilité, et leur biocompatibilité avec des chondrocytes nasaux en hydrogel de fibrine, après 3 semaines de culture in vitro, puis 6 semaines de culture in vivo sous la peau de la souris nude. Les essais d'imprimabilité, puis les analyses de la matrice extra cellulaire obtenue en

PCR, en Western Blot réalisées après 3 semaines in vitro puis après 6 semaines in vivo, ont permis de retenir un silicone de grade médical. Le matériau sélectionné a ensuite été imprimé selon une forme inspirée des techniques chirurgicales actuelles. Ce support à taille réelle a subi des tests mécaniques pour atteindre un module d'Young proche du cartilage de la cloison native. Puis, il a été placé dans un moule et recouvert d'un gel de fibrine chargé de chondrocytes nasaux et cultivé pendant 3 semaines in vitro. La qualité de la matrice extracellulaire obtenue autour du support a été analysée par des tests d'immunofluorescence sur le collagène de type II. La manipulabilité de la prothèse de cloison nasale construite, et sa capacité à soutenir le dos du nez pour lui rendre sa forme et sa fonction, ont été testés par des essais sur cadavres, car il n'existe pas de modèle animal pour le nez humain. Notre étude a permis de sélectionner un matériau imprimable et biocompatible, puis de fabriquer une prothèse de cloison nasale humaine associant des chondrocytes nasaux humains.

Mots-Clés : Cartilage, Nez, Ingénierie tissulaire, Impression 3D, Mécanique, Biomatériau, Biocompatibilité.

Titre et résumé en anglais

Reconstruction of the cartilage of the nose with 3D printing and tissue engineering

Our project is based on the association of three teams that have pooled their expertise to enable this interdisciplinary work combining cell biology, 3D printing, and surgical skills. The aim is to manufacture a cartilage prosthesis of the human nasal septum using 3D printing and tissue engineering. Reconstructive surgery of the nose is often hampered by a lack of cartilage. The cartilage of the nasal septum is the key element of the nose. Its role is both morphological to give the specific projected shape of the human nose, and functional to keep the nasal cavity permeable during inspiration. Thus the nasal septum has both a major morphological and functional role. Unfortunately, the nose is an organ exposed to trauma or loss of substance in the case of malignant tumor removal. Moreover, the cartilage is an avascular tissue, which results in a lack of regenerative capacity. Reconstruction of the nose must therefore use autologous cartilage grafts harvested from the ear or from the rib, with morbidity of the donor site for the patient. Alloplastic implants exist, but present a very high risk of superinfection and rejection. This is why surgeons are now turning to tissue engineering to avoid these pitfalls. The mechanical properties of cartilage are very important and must be mimicked by tissue engineered tissue. We imagined a concept of nasal septum prosthesis combining a structural support made of a medical grade material, with a porous structure, 3D printable, covered with a fibrin hydrogel loaded with human nasal chondrocytes, to meet the mechanical challenges and improve the immunotolerance of the constructed tissue. The human nasal chondrocytes are obtained by donation of surgical residues from patients who have given their consent. The amplification of the chondrocytes, then their culture in fibrin hydrogel, was carried out using soluble chondrogenic factors, according to a protocol which had already shown its effectiveness on nasal and articular chondrocytes, in contact with various liquid or solid supports. In the first part of our study, we selected a material among two candidate materials, by testing the printability of each material, and its biocompatibility with nasal chondrocytes in fibrin hydrogel, after 3 weeks of in vitro culture, then 6 weeks of in vivo culture under the skin of nude mice. The printability tests, then the PCR and Western Blot analyses performed after 3 weeks in vitro and after 6 weeks in vivo, of the extracellular matrix of the tissue obtained,

allowed us to retain a medical grade silicone. In the second part of our study, the selected material was printed in a shape inspired by current surgical techniques. This full-size support underwent mechanical tests to reach a Young's modulus close to the native septum cartilage. Then, it was covered in a mold with a fibrin hydrogel loaded with nasal chondrocytes and cultured for 3 weeks in vitro. The quality of the extracellular matrix obtained around the support was analyzed by immunofluorescence tests on type II collagen. The manipulability of the constructed septum prosthesis, and its ability to support the dorsum of the nose to restore its shape and function, was tested in cadavers, as there is no animal model for the human nose. At the end of this study, we have been able to select a printable, biocompatible material and to manufacture a human septum prosthesis combining nasal human chondrocytes.

Keywords : Cartilage, Nose, Tissue engineering, 3D Printing, Mechanical strength, Biomaterial, Biocompatibility.

Remerciements

Pour ce travail de Thèse de Sciences, je souhaite remercier toute l'équipe ROAD, et en premier lieu Frédéric Mallein-Gerin. Cher Frédéric, je te remercie de m'avoir accueillie dans ton équipe, et de m'avoir permis de me frotter à la recherche scientifique. Cet intérêt pour la recherche a toujours été présent pour moi, et c'est un réel plaisir d'avoir pu grâce à ton accueil et aux membres de ton équipe, allier désormais la recherche à l'exercice de la médecine. Ton ouverture d'esprit, ta bienveillance et ta patience ont été pour moi des éléments capitaux pour me permettre de mener ce travail. Merci d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Le germe de ce travail de thèse doit également beaucoup au Professeur François Disant, qui m'a emmené avec lui au LBTI il y a plus de 10 ans. Je ne pensais pas à ce moment-là, que cette collaboration me mènerait à une Thèse de Sciences aujourd'hui. Cher François, je vous remercie de m'avoir fait confiance depuis toujours.

Je dois aussi beaucoup remercier Jean-Daniel Malcor, mon co-directeur de thèse, pour ses conseils et le temps passé pour m'aider dans ce travail. Cher Jean-Daniel, je te remercie pour ton aide décisive dans les manipulations, et dans la rédaction des travaux, tout particulièrement en anglais!

Je remercie Émeline Perrier-Groult et Marielle Padeloup, pour tout le travail fourni pendant ces années, puisque le projet Nasaltis se développe depuis bien longtemps, et que j'ai pu profiter de leur expérience pour aller plus loin.

Ce travail est transdisciplinaire et je dois aussi beaucoup à Christophe Marquette et Edwin-Joffrey Courtial de l'équipe 3d.FAB. Je vous remercie pour votre aide et pour vos explications dans le domaine de l'impression 3D.

Je remercie tout particulièrement Mesdames Magali Demoor et Delphine Logeart-Avramoglou d'avoir accepté le rôle de rapportrices au sein du jury. J'ai beaucoup apprécié leurs analyses très constructives transmises après la lecture du manuscrit.

Je remercie Monsieur Jean-Christophe Farges pour son soutien et son partage d'expérience, et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je souhaite remercier le personnel du Laboratoire d'Anatomie de la Faculté Rockefeller et en particulier Vanessa, pour leur gentillesse et leur aide irremplaçable dans l'organisation des dissections et des essais.

Je tiens aussi à remercier la plateforme ICAP Innovation, Conception et Accompagnement pour la Pédagogie de l'Université Lyon 1, et en particulier Mme Billaud pour sa patience et ses compétences.

Je remercie aussi Mourad Bekhouche, Jérôme Laffont, Maxime Ducret, pour leurs conseils et leur soutien régulier.

Je n'oublie pas non plus Arnaud Dulom pour son coup de main, Shérine Moustaghfir, Joévin Barrier, et Marianne Lévêque.

Je remercie mes collègues ORL qui m'ont encouragée dans l'effort : Éric Truy, Sandra Zaouche, Clémentine Daveau, Sophie Jacquot-Laperrière, Sonia Ayari, Ruben Hermann, Margaux Grall, Aurélie Coudert, Sylvie Poignonec, et mes internes Fatemah, Yonjae, Aurélien, Léonard, et tous ceux que j'oublie.

Je pense aussi à Maud Robert (un peu ORL aussi), et Naoual Bakrin.

Je pense aussi à mes parents, ma soeur et mon frère et leurs proches, car leur amour est un réconfort inestimable.

Enfin, je souhaite dédier ce travail de Thèse de Sciences à mon mari Antoine, et à mes enfants adorés Lola et Noé. Je vous remercie pour votre amour et votre soutien, même si j'ai souvent pensé que je devais surtout vous demander pardon pour ces heures trop nombreuses où mon travail déborde sur notre vie ensemble.

Il n'est pas facile de remercier tous ceux qui, au long du chemin, ont semé un caillou ou apporté une pierre. J'espère ne pas avoir oublié trop de monde. Merci à tous de travailler par vos recherches, votre travail, et vos actes, à créer un monde meilleur.

Sommaire

Liste des abréviations et terminologie anglophone.....p 17

Liste des figures.....p 19

Préambule.....p 25

Introduction générale.....p 27

Introduction bibliographique.....p 31

1. Anatomie et embryologie du nez et de la cloison nasale.

1.1. Anatomie.

1.2. Embryologie

1.3. Origine embryonnaire des chondrocytes.

2. Histologie du cartilage septal et de la muqueuse respiratoire nasale.....p 36

2.1. Histologie du cartilage.

2.2. Histologie de la muqueuse nasale.

3. Importance de la cloison nasale dans le nez humain.....p 41

4. Les problématiques actuelles liées à l'atteinte du cartilage de la cloison.....p 42

4.1. Les déformations naturelles ou traumatiques.

4.2. Les pertes de substances acquises et les destructions du cartilage septal.

5. Les réparations actuelles des déficits et pertes de substance de la cloison nasale.....p 44

5.1. Le principe du L de Killian.

5.2 Les techniques de greffons structurants.

5.3. La septoplastie extracorporelle.

5.4. Les greffons structurants de conque ou de côte.....p 48

5.5. Les implants du nez.

5.6. Les épithèses nasales.

6. État de connaissances en ingénierie tissulaire du cartilage nasal.....p 51

7. Apport de l'impression 3D.....p 58

- Liberté du design.

- Évolutivité du prototypage.

- Rapidité de production.

- Personnalisation.

8. Article issu de la thèse.....p 60

Objectif de l'étude : Le concept NASALTIS : Fabrication d'une prothèse de septum nasal.....p 77

- Cahier des charges de chaque élément.

- Le scaffold.

- L'hydrogel de fibrine.

- Les chondrocytes.

- Résumé schématique du déroulement de l'étude.....p 81

Matériels et Méthodes.....p 83

1. Protocole de collecte des échantillons cartilagineux.

2. Protocole d'extraction des chondrocytes.

3. Protocole d'amplification des chondrocytes.....p 85

4. Protocole de préparation du construit cartilagineux : préparation du gel de fibrine puis du gel de chondrocytes, puis coulage dans le moule sur le scaffold, et culture cellulaire.

5. Protocole d'analyse de la viabilité cellulaire par test LIVE/DEAD.....p 86

<u>6. Protocole d'analyse de l'expression des gènes par Reverse Polymerase Chain Reaction PCR.</u>	
<u>6.1. Protocole d'extraction des ARN</u>	
<u>6.2. Protocole de transcription inversée.</u>	
<u>6.3. Protocole de PCR.</u>	
<u>7. Protocole d'analyse des synthèses protéiques par Western Blot.....</u>	<u>p 89</u>
<u>8. Protocole d'analyse par immunomarquage du collagène de type II.</u>	
<u>9. Matériel utilisé pour les étapes liées à l'impression 3D.....</u>	<u>p 91</u>

Résultats et discussion

1ère partie : Sélection d'un matériau imprimable et biocompatible à partir de 2 matériaux candidats.....	p 93
---	-------------

R.1. Résultats et discussion

<u>R.1.1 : Développement d'un scaffold centimétrique et imprimabilité des 2 matériaux-candidats</u>	
:	

R.1.1.1 : Les matériaux candidats.

R.1.1.2. : Élaboration du scaffold centimétrique.

<u>R.1.2. : Étude de biocompatibilité avec chaque biomatériau.....</u>	<u>p 97</u>
--	-------------

R.1.2.1. : Obtention d'un gel de chondrocytes.

- Don de résidus opératoires.

- Extraction des chondrocytes.

- Amplification des chondrocytes.

- Coulage des chondrocytes en hydrogel de fibrine puis ensemencement des scaffolds centimétriques.

R.1.2.2. : Étude de la biocompatibilité après culture in vitro des construits.....

- Culture in vitro et évolution du phénotype cellulaire.

- Analyses des expressions géniques par PCR sur les construits en P60 et en MED-4850.

- Analyses des sécrétions protéiques par Western Blot.

- Analyses en immunofluorescence du collagène de type II.

Conclusion des analyses à la fin de la culture in vitro pendant 3 semaines :

R.1.2.3. : Évolution de la stabilité des construits centimétriques après implantation chez la souris nude pendant 6 semaines.....p 107

- Analyse macroscopique après explantation :

- Analyses par immunofluorescence sur le Collagène de type II après explantation.

Discussion.....p 111

2ème partie : Développement d'une prothèse de cartilage nasal de taille réelle associant un scaffold biocompatible et un gel de cartilage.....p 113

R.2. Résultats et discussion.

R.2.1. - Études mécaniques sur septum cartilagineux de cadavres frais pour déterminer des références du module d'Young par flexion 3 points et compression.

R.2.1.1. Prélèvement de 6 septums au laboratoire d'anatomie Rockefeller de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

R.2.1.2. Étude DMA (Dynamic Mechanical Analysis) au laboratoire 3d FAB sur le site de la Doua de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

R.2.2.- Développement d'un scaffold de taille réelle inspiré de la technique de septoplastie extracorporelle.....p 117

R.2.2.1. Design du scaffold de taille réelle.

R.2.2.2. Tests d'imprimabilité et adaptations liées au modèle.

R.2.3. Fabrication du construit à taille réelle.....p 123

R.2.3.1. Élaboration du moule obtenu par impression 3D.

R.2.3.2. Analyses DMA sur construit taille réelle :

R.2.3.3. Élaboration d'un construit à taille réelle avec coulage d'un gel de chondrocytes dans le moule adapté.

R.2.4. Culture in vitro pendant 3 semaines puis vérification de la viabilité cellulaire et de la qualité de la matrice extracellulaire.....p 127

R.2.4.1. Analyse de la viabilité cellulaire par test LIVE-DEAD.

R.2.4.2. Analyses par immunofluorescence du collagène de type II.

Discussion.....p 131

<u>R.2.5. Essai sur cadavre pour modèle clinique</u>	p 132
<u>Discussion générale et perspectives</u>	p 139
<u>Conclusion générale</u>	p 145
<u>Bibliographie</u>	p 147
<u>Annexes</u>	p 151

Liste des abréviations et terminologie anglophone.

2D : Bidimensionnel

3D : Tridimensionnel

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide Ribonucléique.

BIT : BMP2 + Insuline + Triiodothyronine.

BMP2 : Bone Morphogenetic Protein 2

CE : Communauté Européenne

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

FDM : Fused Deposition Modeling

FI : FGF2 + Insuline

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2

HCL : Hospices Civils de Lyon

INPI : Institut National de la Propriété Intellectuelle

LBTI : Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique

LSR 4370 : Silicone médical

MED-4850 : Silicone médical

MTIPP : Médicament de Thérapie Innovante à Production Ponctuelle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PVA : Polyvinyl Acetate

P60 : Porolay

ROAD : Recherche en Ostéo Articulaire et Dentaire

SLA: Stereo Lithography Apparatus

SLS : SLS Selective Laser Sintering

UFBT : Union Française des Blessés de la Tête

Scaffold (en anglais) : Support structurel.

Liste des Figures.

Figure 1 : Anatomie du nez cartilagineux en vue de face et en vue basale.....	p22
Figure 2 : Coupe sagittale médiane de la face dans le plan de la cloison nasale.....	p23
Figure 3 : Développement embryonnaire de la face.....	p24
Figure 4 : Développement de la cloison nasale humaine à la 7ème semaine de vie embryonnaire.....	p25
Figure 5 : Coupe transversale de l'embryon à la 4ème semaine, schématisant l'origine embryonnaire différente du cartilage articulaire du cartilage nasal.....	p26
Figure 6 : Schéma représentant les composants de la matrice extracellulaire du cartilage....	p28
Figure 7 : Agrégats de protéoglycanes.....	p28
Figure 8 : Observation en microscopie optique des 3 types de cartilage.....	p29
Figure 9 : Schéma d'une coupe sagittale médiane de la face montrant le bulbe olfactif intracrânien et la région de la muqueuse olfactive.....	p30
Figure 10 : Schéma de la muqueuse respiratoire nasale en coupe histologique.....	p31
Figure 11 : Schéma illustrant le principe du L de Killian après septoplastie ou réparation de la cloison nasale.....	p36
Figure 12 : Schéma illustrant le positionnement de greffons structurants pour reconstituer l'arête nasale.....	p37
Figure 13 : Construction de la cloison nasale par la technique de septoplastie extracorporelle.....	p38
Figure 14 : Illustration du positionnement de la cloison construite par technique extracorporelle dans le nez, en répondant à tous les rapports anatomiques natifs.....	p38
Figure 15 : Photo opératoire de la cloison reconstruite par septoplastie extracorporelle en place, par abord de voie externe.....	p39
Figure 16 : Photo de fragments de cartilage costal avant taille et assemblage sur la table opératoire.....	p40
Figure 17 : A : Implant en silicone utilisé pour augmenter le nez. B : Extrusion progressive de l'implant à travers la peau de la racine du nez.....	p41
Figure 18 : A, B : Patient amputé de la pyramide nasale suite à l'exérèse d'une tumeur cancéreuse, en vue de face et de 3/4. C, D : Patient équipé d'une épithèse nasale collée en vue de face et de 3/4.....	p42
Figure 19 : Illustration schématique d'une prothèse de cloison nasale formée d'un scaffold de structure poreuse (en bleu) recouvert d'un hydrogel de chondrocytes (vert).....	p47
Figure 20 : Schéma de synthèse du concept interdisciplinaire NASALTIS.....	p70
Figure 21 : Modèle théorique généré par le logiciel en vue supérieure (A) et en vue latérale avec la porosité en héli sablier (B).....	p88
Figure 22 : Résultat de l'impression : Observation des porosités obtenues en vue de surface et en vue de profil et comparaison des modèles théoriques en microscopie optique.....	p89
Figure 23 : Tableau de comparaison des paramètres d'impression et des mesures de porosité pour le MED-4850 et le P60, en fonction des paramètres des pores en hémisablier.....	p89
Figure 24 : Évolution du phénotype des chondrocytes après amplification avec FI puis culture avec BIT.....	p92
Figure 25 : Résumé du protocole de fabrication des construits centimétriques.....	p94
Figure 26 : Redifférenciation chondrocytaire médiée par les facteurs solubles chondrogéniques en synergie avec le caractère tridimensionnel du support pendant la culture.....	p95

Figure 27 : Aspect comparatif des scaffolds centimétriques de P60 et de MED-4850 recouverts de l'hydrogel de fibrine chargé de chondrocytes au moment du coulage (avant la culture), puis après 3 semaines de culture en milieu BIT.....	p96
Figure 28 : PCR comparatives entre les contrôles cultivés 3 semaines sans BIT, et les construits cultivés 3 semaines avec BIT.....	p97
Figure 29 : Analyses Western Blot comparatives entre les contrôles cultivés pendant 3 semaines sans BIT, et les construits cultivés pendant 3 semaines avec BIT.....	p98
Figure 30 : Observation comparative entre les construits en P60 et en MED-4850 en immunofluorescence du collagène de type II en microscopie à la fin de la culture in vitro avec le cocktail BIT.....	p100
Figure 31 : Implantation en position dorsale chez la souris nude d'un construit P60 et un construit MED-4850.....	p102
Figure 32 : Aspects macroscopiques des construits centimétriques après explantation de la souris.....	p103
Figure 33 : Immunofluorescence du collagène de type II après explantation de la souris.....	p104
Figure 34 : 6 septums de cadavres prélevés au laboratoire d'Anatomie. Matériel de prélèvement par bistouri et emporte-pièce des deux fragments étudiés.....	p107
Figure 35 : Principe des tests de compression et de flexion 3 points.....	p108
Figure 36 : Machine de DMA équipée du module de flexion 3 points (à gauche), et du module de compression (à droite).....	p109
Figure 37 : Diagramme d'expression du module d'Young en fonction de la force appliquée en flexion 3 points.....	p109
Figure 38 : Diagramme d'expression de la déformation du cartilage en fonction de l'intensité de la compression exercée.....	p110
Figure 39 : Projection du principe du L de Killian avec une prothèse de septum nasal dont le scaffold serait un biomatériau structuré en maille pour obtenir une porosité.....	p111
Figure 40 : Plan technique du scaffold de la prothèse de cloison nasale déposée à l'INPI.....	p113
Figure 41 : Certificat d'identité du modèle de scaffold de prothèse de septum nasal.....	p114
Figure 42 : Modélisation informatique du scaffold de taille réelle en vue de profil, avec structuration en mailles par la technique FDM (Filament Deposition Modeling) en impression 3D.....	p114
Figure 43 : Modélisation informatique du scaffold de taille réelle en vue de 3/4.....	p115
Figure 44 : Élaboration de plusieurs prototypes de densité variable.....	p115
Figure 45 : Diagramme d'expression du module d'Young en fonction de la force appliquée en flexion 3 points, sur les prototypes de taille réelle et de densités différentes, ainsi que sur un prototype recouvert d'un gel de fibrine, avec comparaison au résultat d'un septum natif.....	p116
Figure 46 : Moule bivalve de première génération avec tunnel d'injection décline unique et évent positionné au point le plus haut.....	p118
Figure 47 : Résultats des premières injections avec la fibrine seule.....	p119
Figure 48 : Moule de deuxième génération avec double tunnel d'injection et modification de l'évent.....	p119
Figure 49 : Montage des seringues de gel de fibrine et de chondrocytes sur les injecteurs LUER-LOCK de chaque valve du moule, avec l'évent libre à la partie la plus haute du moule.....	p120
Figure 50 : Le construit est laissé pendant 30 mn dans le moule avant le démoulage, pour laisser la fibrine coaguler.....	p121
Figure 51 : Observation du construit de taille réelle après démoulage.....	p121

Figure 52 : Observation au microscope des résultats du test LIVE/DEAD.....	p122
Figure 53 : Schéma de la position des fragments prélevés sur les construits pour réaliser les analyses en immunofluorescence.....	p123
Figure 54 : Observation d'un fragment isolé du construit selon le schéma sus-jacent.....	p124
Figure 55 : Observation d'un 2ème fragment isolé du construit selon le schéma sus-jacent...	p125
Figure 56 : Dépose du cartilage septal natif par une technique de voie externe utilisée en rhinoseptoplastie.....	p128
Figure 57 : Comparaison du cartilage natif et du construit à taille réelle.....	p128
Figure 58 : Ostéotomie de la racine du nez pour créer une zone en tenon-mortaise où viendra s'emboîter le construit pour assurer son maintien en position anatomique.....	p129
Figure 59 : Insertion du prototype en position anatomique entre les 2 feuillets muqueux, en utilisant des instruments chirurgicaux habituels.....	p129
Figure 60 : Comparaison entre une photo et un schéma de l'implantation en vue basale.....	p130
Figure 61 : Comparaison des rapports anatomiques entre le septum natif en place (A, B) et la prothèse de cloison en place (C, D).....	p130
Figure 62 : Comparaison du profil initial du patient puis du profil avec la prothèse en place.....	p131

**Reconstruction du cartilage de la cloison nasale par
ingénierie tissulaire et impression 3D : le projet
NASALTIS.**

Préambule.

Depuis 20 ans, je me suis mise au service des patients atteints au niveau de leur visage par la maladie, les accidents, ou les malformations congénitales. Chirurgienne ORL et cervico-faciale de formation, j'ai toujours exercé une activité hospitalière au sein du CHU de Lyon, et je me suis spécialisée dans la chirurgie reconstructrice du visage.

Mon activité clinique et la prise en charge des patients m'ont toujours amené à rechercher la meilleure proposition thérapeutique, pour le meilleur résultat pour le patient. Les réparations actuelles nécessitent toujours le prélèvement de tissus sains sur le patient pour réparer la partie lésée, créant ainsi une autre séquelle. Les comorbidités liées à ces prélèvements entachent pour le patient le résultat de notre travail, et sont un déchirement pour le médecin que je suis. Depuis toujours intéressée par la recherche scientifique et les progrès qu'elle apporte pour nos patients, c'est naturellement que j'ai débuté une collaboration avec l'équipe de Frédéric Mallein-Gerin à partir de 2012. La reconstruction du cartilage, matériau ô combien noble et versatile pour le chirurgien, est un enjeu dans la chirurgie réparatrice du nez, pour la réparation de sa fonction respiratoire comme de sa forme. Le projet de reconstruction du cartilage de la cloison nasale a germé il y a des années, et a donné lieu à plusieurs études préliminaires au sein du laboratoire, et j'ai eu l'honneur de participer à certaines d'entre elles (1 et 2). La biologie et l'ingénierie tissulaire sont des domaines extrêmement prometteurs pour la réparation du visage, et qui méritent un investissement interdisciplinaire de scientifiques et de médecins.

C'est ce cheminement qui m'a amené à débiter une Thèse de Sciences en 2019.

(1) Reconstruction of nasal cartilage defects using a tissue engineering technique based on combination of high-density polyethylene and hydrogel.

Durbec M, Mayer N, Vertu-Ciolino D, Disant F, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E. *Pathol Biol (Paris)*. 2014 Jun;62(3):137-45.

(2) Combination of bioactive factors and IEIK13 self-assembling peptide hydrogel promotes cartilage matrix production by human nasal chondrocytes.

Dufour A, Buffier M, Vertu-Ciolino D, Disant F, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E. *J Biomed Mater Res A*. 2019 Apr;107(4):893-903.

Introduction générale :

De nos jours, la santé se définit comme un état de bien-être physique, mental et social, et ne consiste pas seulement dans une absence de maladie ou d'infirmité. Cette définition est exprimée depuis 1946 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)(1). Ainsi, dans nos sociétés, la reconstruction après traumatismes, maladies ou malformations congénitales, est devenue très importante, car au-delà d'une réparation physique, les patients veulent retrouver une qualité de vie après la maladie, leur permettant de reprendre une vie sociale et professionnelle.

La chirurgie réparatrice du visage a pris un tournant décisif au XXe siècle, en réponse aux ravages de la première guerre mondiale sur les soldats confrontés à des armes très puissantes. Le nombre de blessés du visage a été gigantesque, et en France, des chirurgiens d'exception dont le Dr Morestin ont été les pionniers de la chirurgie réparatrice du visage (2). Ces chirurgiens ont su utiliser leur savoir-faire, puis développer et inventer des techniques innovantes, pour réparer les blessures mais aussi rendre un visage à ces soldats, mais aussi leur permettre de vivre dans la dignité. L'Union des Blessés de la Face et de la Tête (UBFT), ensuite appelée "Les Gueules Cassées", est une association créée en 1921 par trois grands blessés de la face pour venir en aide à leurs camarades blessés au visage, défigurés, abandonnés de tous et sans ressources (3).

Les techniques de greffes de tissus, et de lambeaux locaux puis libres, toujours utilisées de nos jours, ont été développées à cette époque. Elles ont permis de formidables avancées, mais parfois au prix de prélèvement de tissus dans des zones saines des patients, créant alors une morbidité au niveau du site donneur. Les progrès en chirurgie ont toujours essayé de surmonter cette problématique, et le champ de l'ingénierie tissulaire offre aujourd'hui des espoirs immenses. Les scientifiques et les chirurgiens collaborent désormais pour trouver des synergies et aboutir à des avancées au service des patients.

Au sein du visage, le nez a une place particulière, car il participe de façon incontournable à l'esthétique du visage, et il a aussi un rôle fonctionnel respiratoire capital. C'est aussi un organe très exposé, dont les lésions traumatiques peuvent être fréquentes, or ses caractéristiques morphologiques nous ancrent dans notre humanité, et sa perte ou sa déformation induit des conséquences psychologiques dramatiques sur l'image de soi. La structure cutanéocartilagineuse de la pyramide nasale, est très spécifique, et les chirurgiens sont confrontés à la

perte de tissu cartilagineux pour la chirurgie du nez, entraînant des déformations et des pathologies fonctionnelles. Actuellement, la reconstruction du nez s'appuie toujours beaucoup sur le prélèvement de cartilage autologue au niveau des oreilles ou des côtes des patients. Pour éviter cela, des procédés de camouflage utilisent des implants alloplastiques, mais ils sont souvent mal tolérés par l'organisme et font l'objet de surinfections ou de rejet (4)(5).

L'équipe ROAD (Recherche Ostéo Articulaire et Dentaire) au LBTI (Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique) à Lyon a développé une expertise sur le tissu cartilagineux depuis de nombreuses années. Les premiers travaux ont porté sur le cartilage articulaire et les pathologies arthrosiques, puis les études se sont aussi intéressées au cartilage nasal (6)(7). Les chondrocytes issus du cartilage de la cloison nasale (aussi appelée septum nasal) sont révélés plus vigoureux que ceux issus du cartilage articulaire pour l'amplification et la culture cellulaire (8) dans l'expérience du laboratoire et de nombreuses équipes. Le cartilage de la cloison nasale a par ailleurs l'avantage de pouvoir être facilement étudié, car la chirurgie du nez génère des résidus opératoires.

Jusqu'à présent, les équipes qui travaillent sur la reconstruction du nez par ingénierie tissulaire sont très majoritairement tournées vers l'aspect plastique ou esthétique du nez, le plus souvent sans considération respiratoire. Il s'agit en général de fabriquer une prothèse susceptible de modifier la forme du nez pour combler un déficit acquis, ou pour augmenter la hauteur du profil. Ce type de demande est très fréquente en Asie, où la tendance est à l'augmentation du nez pour obtenir un nez aux caractéristiques occidentales. La prothèse est positionnée de façon ectopique sous la peau du dos du nez, sans connexion avec le reste de la structure nasale, ni objectifs respiratoires. Elle doit soulever la peau sans autre rôle mécanique et les études ne contiennent que rarement des analyses mécaniques transposables à la reconstruction du septum nasal. Ce type de prothèses développées par ingénierie tissulaire utilise souvent un scaffold (support structurel) résorbable, pour s'affranchir du risque infectieux sur le long terme. Cependant, ce type de scaffold ne permet pas d'avoir une stabilité des qualités mécaniques du tissu construit dans le temps.

La collaboration entre le laboratoire LBTI et mon équipe a commencé avec le Pr François Disant en 2012. Nous avons décidé de mettre en commun nos expertises, pour développer une prothèse de cloison nasale cartilagineuse. Ce cartilage est la pièce maîtresse de la structure nasale, dans le sens où il confère à la fois sa forme au nez, mais aussi la majeure partie de ses qualités mécaniques qui sont nécessaires à la perméabilité nasale lors de la respiration. Le tissu construit doit essayer d'atteindre les qualités biologiques et mécaniques les plus proches

possibles du cartilage septal natif. Dans notre idée, les qualités mécaniques du cartilage construit sont capitales, de même que sa biocompatibilité.

Actuellement, l'ingénierie du cartilage utilise des scaffolds pour contrôler la forme et la qualité mécanique du tissu construit. La mise en commun de nos expertises a mené à un concept de prothèse de septum nasal qui associe un scaffold fabriqué en matériau non résorbable. Un hydrogel chargé de chondrocytes autologues doit recouvrir le matériau, puis être progressivement remplacé par la matrice extracellulaire secrétée par les chondrocytes, pour isoler le matériau et éviter sa colonisation par des germes.

Le scaffold doit être de structure poreuse et hydrophile en surface, pour permettre l'ancrage du gel de chondrocytes et un enrobage. L'impression 3D permet d'obtenir ce type de structure.

Le choix du matériau sélectionné pour la fabrication du scaffold est soumis à un cahier des charges très complexe. Ce matériau doit être biocompatible et de grade médical, imprimable en impression 3D, biomimétique au cartilage septal natif sur le plan des qualités mécaniques, et stable dans le temps pour ne pas faire varier les qualités mécaniques, ni générer des produits de dégradation susceptibles de créer une inflammation ou des substrats toxiques.

Notre étude se distingue par l'importance donnée aux qualités mécaniques du tissu construit pour reproduire le cartilage de septum nasal, et donc par l'utilisation d'un scaffold non résorbable.

Introduction bibliographique.

1. Anatomie et embryologie du nez et de la cloison nasale.

1.1. Anatomie.

Le nez est un organe respiratoire et olfactif, en position centrale dans le visage. Il présente une partie saillante au niveau du visage, appelée pyramide nasale, et se prolonge par deux cavités à-travers les os de la face. La cloison nasale, aussi appelée septum nasal, est une paroi impaire qui sépare la cavité nasale en deux parties égales dans le sens sagittal. Elle repose sur le palais osseux en bas et rejoint l'arête nasale en haut. Elle n'atteint pas le plan vertébral en arrière, mais laisse une cavité unique appelé nasopharynx. La cavité nasale est encadrée en bas par les processus palatins des maxillaires supérieurs, qui la limitent également sur les côtés en formant l'orifice piriforme par leurs processus nasaux. L'auvent nasal a une architecture complexe à la structure cartilagineuse en avant avec les cartilages alaires et triangulaires, puis osseuse en arrière formée par les os propres du nez, recouverte de peau.

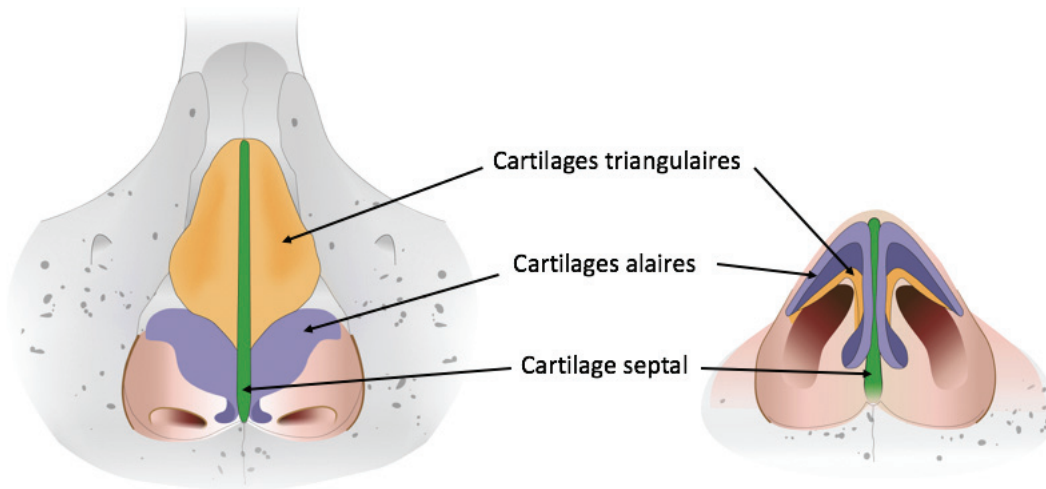


Figure 1 : Anatomie du nez cartilagineux en vue de face et en vue basale. Le cartilage septal n'apparaît de face qu'au niveau de l'arête nasale, car il soutient les cartilages alaires et triangulaires qui arment les faces latérales du nez. (Figures originales Dr Vertu-Ciolino).

Les cavités nasales sont séparées de la cavité encéphalique en haut par l'éthmoïde et le sphénoïde qui forme la base osseuse du crâne.

La particularité de la cloison nasale est d'être formée de l'assemblage de deux os dans sa partie postérieure, et d'un cartilage dans sa partie antérieure. Ces différentes pièces anatomiques ont une origine embryologique différente, et ont suivi des vecteurs de développement confluents, expliquant les déformations d'allure tectoniques au sein de cette cloison. Le cartilage septal est parfois appelé cartilage quadrangulaire. La partie osseuse postérieure de la cloison est formée par la lame perpendiculaire de l'éthmoïde en haut, et l'os vomer en bas.

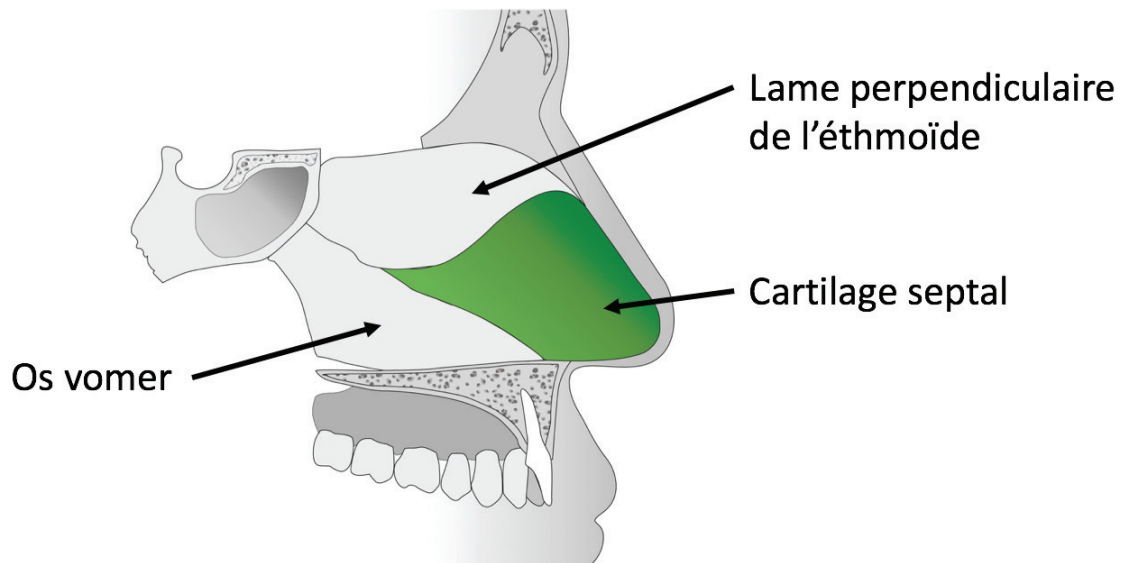


Figure 2 : Coupe sagittale médiane de la face dans le plan de la cloison nasale. (Figure originale Dr Vertu-Ciolino).

1.2. Embryologie du septum nasal.

L'ontogénèse du nez étudie le développement embryonnaire à l'échelle de l'individu.

La face humaine se forme entre la 4ème et la 10ème semaine de vie intra-utérine, à partir du bourgeon nasofrontal et des bourgeons maxillaires supérieurs et inférieurs dérivés du premier arc branchial. Les bourgeons inférieurs fusionnent précocement pour former l'arc mandibulaire. Deux épaissements ectodermiques apparaissent à la partie inférieure du bourgeon nasofrontal à la 5ème semaine, qui deviendront les placodes olfactives. Ils contiennent des cellules ectodermiques neurogènes qui donneront naissance à un organe spécialisé permettant l'intégration d'informations olfactives.

Les placodes olfactives s'invaginent pour créer les cavités nasales primitives. Un bourrelet reste saillant en surface autour de chaque invagination, divisé de chaque côté en bourgeon nasal interne et externe. Les deux bourgeons nasaux internes fusionnent sur la ligne médiane avec le bourgeon médian pour donner naissance au nez et au philtrum (partie médiane de la lèvre supérieure). Les bourgeons nasaux externes fusionnent avec les bourgeons maxillaires supérieurs pour fermer les narines et former la lèvre supérieure de chaque côté du philtrum.

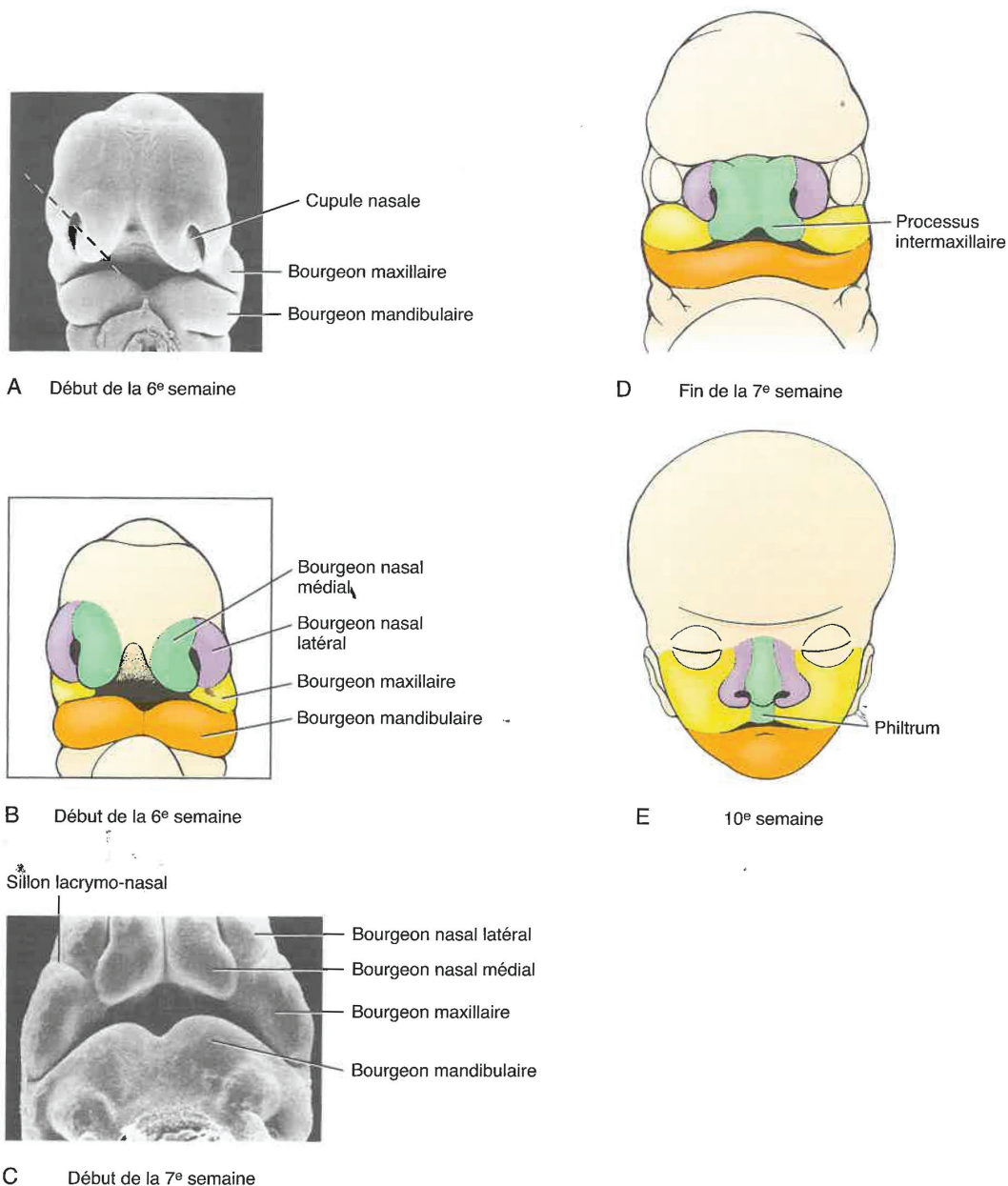


Figure 3 : Développement de la face. A, B : au cours de la 6ème semaine, les placodes nasales s'invaginent et déterminent de chaque côté la formation des bourgeons nasaux latéral et médian. C, D : Au cours de la 7ème semaine, les bourgeons nasaux médians fusionnent entre eux sur la ligne médiane pour former le processus intermaxillaire. E : Dès la 10ème semaine, le processus

intermaxillaire forme le philtrum de la lèvre supérieure. D'après le livre EMBRYOLOGIE HUMAINE Larsen Schoenwolf Bleyl Brauer Francis. West Editions DE BOECK.

Les cavités nasales primitives se creusent de plus en plus, jusqu'à s'ouvrir dans le tube digestif, faisant communiquer la zone nasale olfactive avec la zone oropharyngée, au niveau de la choane primitive. Les fosses nasales primitives sont divisées sagittalement en deux parties par la descente progressive du septum nasal médian. Un processus issu du palais se développe vers le haut, pour fusionner avec le septum nasal issu de la partie haute des fosses nasales, et former la cloison nasale définitive.

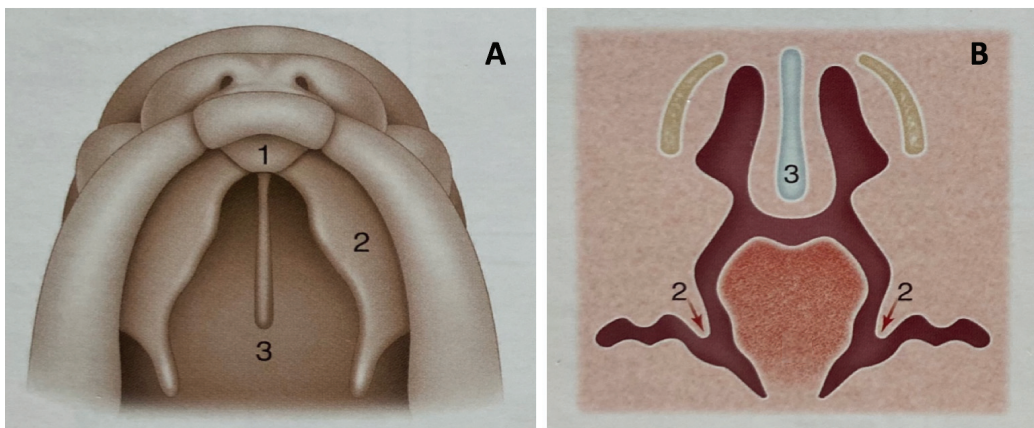


Figure 4 : Développement de la cloison nasale humaine à la 7ème semaine de vie embryonnaire. A : Schéma tridimensionnel du bourgeon maxillaire en vue inférieure montrant le palais primaire (1), les processus palatins (2), et la cloison nasale (3). B : Coupe coronale de la face embryonnaire avec les processus palatins (2) et la cloison nasale (3). D'après le livre EMBRYOLOGIE HUMAINE Larsen Schoenwolf Bleyl Brauer Francis. West Editions DE BOECK.

Ainsi, la cloison nasale définitive est formée de tissus provenant des placodes olfactives en haut, et de tissus provenant du palais secondaire issu du premier arc branchial en bas. Le cartilage quadrangulaire et la lame perpendiculaire de l'ethmoïde appartiennent donc au nez olfactif, et le vomer en bas a une origine branchiale.

L'ontogénèse permet d'expliquer certaines malformations telles que les fentes labio-palatines, par des défauts de fusion de certains bourgeons entre eux, entre la 4ème et la 10ème semaine de vie embryonnaire.

1.3. Origine embryonnaire des chondrocytes.

Le cartilage est un tissu conjonctif de soutien spécialisé pour résister aux forces de compression. Les cellules du cartilage sont les chondrocytes, mais les chondrocytes nasaux et articulaires ont une origine embryonnaire différente.

Les chondrocytes articulaires viennent du mésoderme latéral embryonnaire, alors que les chondrocytes nasaux dérivent des cellules de la crête neurale, d'origine ectodermique. Après fermeture du tube neural, certaines cellules de la partie dorsale du tube appelées crêtes, vont le quitter par phénomène de délamination, puis migrer le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Ces cellules se différencient ensuite en fonction de leur localisation dans l'embryon et de leur destinée. Au niveau de l'extrémité rostrale de l'embryon, les cellules des crêtes neurales vont former les cartilages du nez et les os membraneux du crâne, et pénétrer les arcs branchiaux pour donner la mâchoire, l'os hyoïde, le cartilage thyroïdien, et les osselets de l'oreille moyenne.

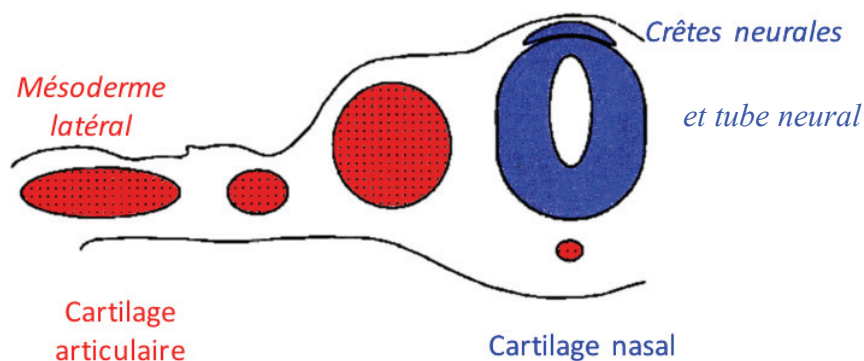


Figure 5 : Coupe transversale de l'embryon à la 4ème semaine, schématisant l'origine embryonnaire différente du cartilage articulaire du cartilage nasal. D'après Karsenty 1998.

2. Histologie du cartilage septal et de la muqueuse nasale.

2.1. Histologie du cartilage.

Le cartilage de l'adulte est un tissu paucicellulaire car il est composé à 99 % de matrice extracellulaire. Il ne contient que des chondrocytes, qui sont des cellules qui ne se divisent quasiment plus. Le taux de renouvellement du tissu cartilagineux mature est très faible, expliquant que la capacité de régénération du cartilage soit très mauvaise. Ces cellules se trouvent dans des logettes appelées chondroplastes, qui contiennent en général une seule cellule au niveau nasal.

Le cartilage ne contient pas de vaisseaux sanguins et les chondrocytes sont nourris par imbibition à partir du périchondre qui est l'enveloppe périphérique très vascularisée autour des cartilages du nez. Après un traumatisme du cartilage, le périchondre engendre un tissu cicatriciel fibreux. Le périchondre n'existe pas au niveau du cartilage articulaire qui est nourri par diffusion du liquide synovial et à partir du tissu osseux sous-jacent.

Les chondrocytes sont des cellules sécrétoires qui synthétisent la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est la partie acellulaire du cartilage. On distingue 3 types de cartilages en fonction de la qualité de leur matrice extracellulaire.

- Le cartilage hyalin :

C'est la plus abondant dans le corps humain, car il forme le cartilage articulaire, le cartilage costal, les cartilages du nez et du larynx ainsi que l'arbre trachéo-bronchique. Sa matrice contient différents types de collagène, mais le collagène de type II est le plus abondant, organisé en fibres. Ces fibres ne sont pas visibles en microscopie optique, conférant à la matrice un aspect réfractile, à l'origine de la qualification du cartilage hyalin (qui a la transparence du verre étymologiquement). Sa matrice contient aussi des agrégats de protéoglycanes associés à des molécules d'acide hyaluronique, aux fortes caractéristiques hydrophiles, expliquant l'abondance du contenu en eau du cartilage mature. Ces protéoglycanes sont formés de glycosaminoglycanes sulfatés associés à un noyau protéique, et s'assemblent ensuite sur de grandes molécules d'acide hyaluronique pour former des agrégats.

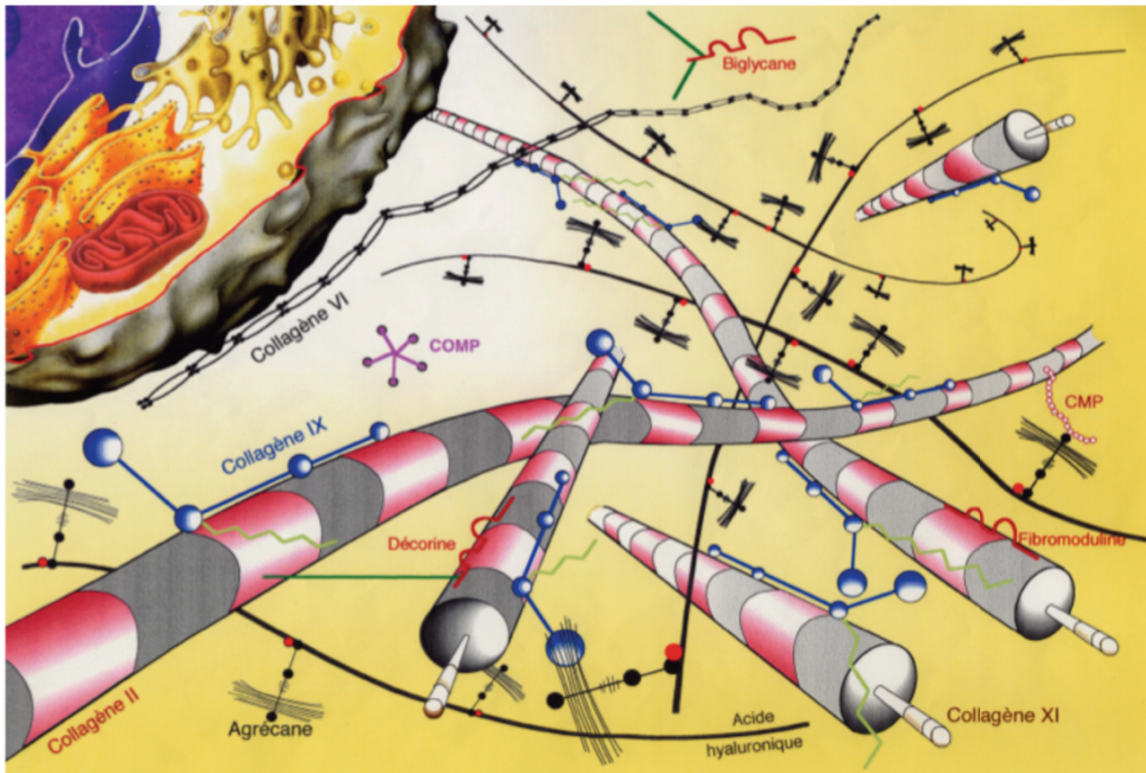


Figure 6 : Schéma représentant les composants de la matrice extracellulaire du cartilage. Le collagène de type II est le plus abondant, et s'organise avec le collagène de type IX et XI pour former des fibres de collagène. Source : Mallein-Gerin F.

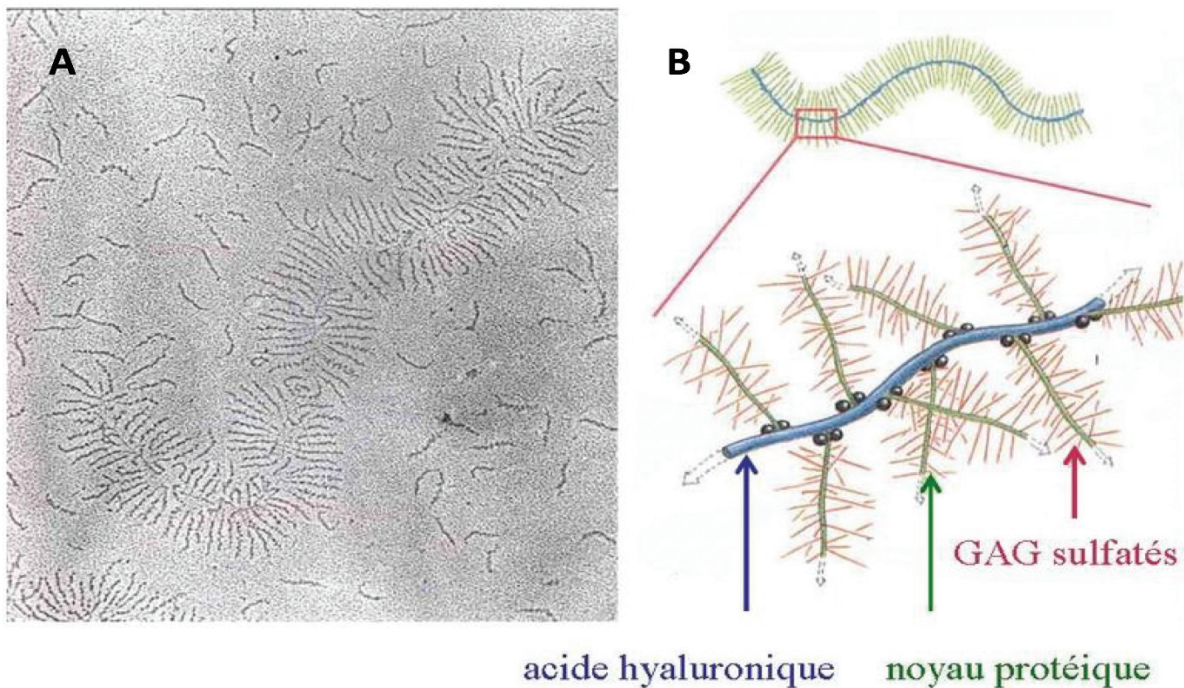


Figure 7 : Agrégats de protéoglycannes. A : En microscopie. B : Schéma montrant les composants de la structure de l'agrégat. D'après le Pr Nataf sur histoblog.viabloga.com/.

- Le cartilage fibreux ou fibrocartilage :

Il est présent au niveau des disques intervertébraux, de la symphyse pubienne et des ménisques. Il est caractérisé par la présence prédominante de collagène de type I, organisé en faisceaux bien visibles en microscopie optique. Ces faisceaux de fibres forment une trame orientée selon les forces qui s'exercent sur le tissu, ce qui le rend très résistant aux tensions. Les chondrocytes semblent parfois alignés en raison de l'abondance des faisceaux de fibres. Il n'a pas de périchondre.

-Le cartilage élastique :

Il est présent au niveau de de l'oreille externe et de l'épiglotte. Il est caractérisé par un réseau de fibres élastiques et une quantité de chondrocytes plus importante. Sa richesse en fibres élastiques lui confère une grande flexibilité, permettant déformation et maintien de la forme des pièces cartilagineuses.

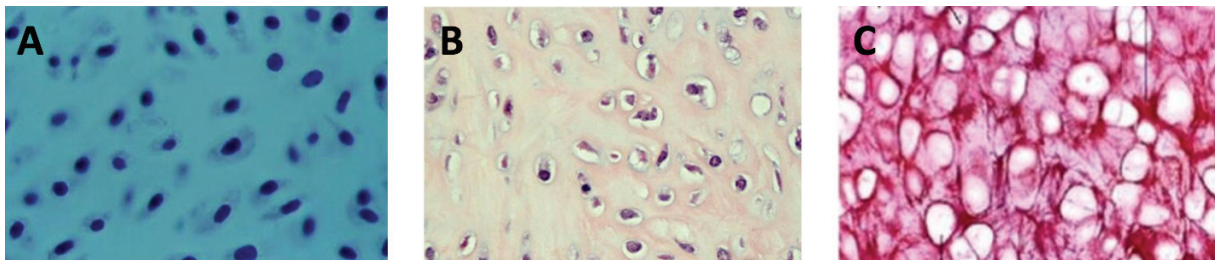


Figure 8 : Observation en microscopie optique des 3 types de cartilage. A : Le cartilage hyalin avec sa matrice réfractile. B : Le cartilage fibreux caractérisé par l'abondance de fibres. C : Le cartilage élastique caractérisé par une quantité de chondrocytes plus importante et la présence de fibres élastiques. D'après le Pr Nataf sur histoblog.viabloga.com/.

La muqueuse nasale :

La muqueuse nasale est divisée en deux zones différentes :

- la muqueuse olfactive dans la région postéro-supérieure de la fosse nasale sous la base du crâne, qui est un épithélium sensoriel.

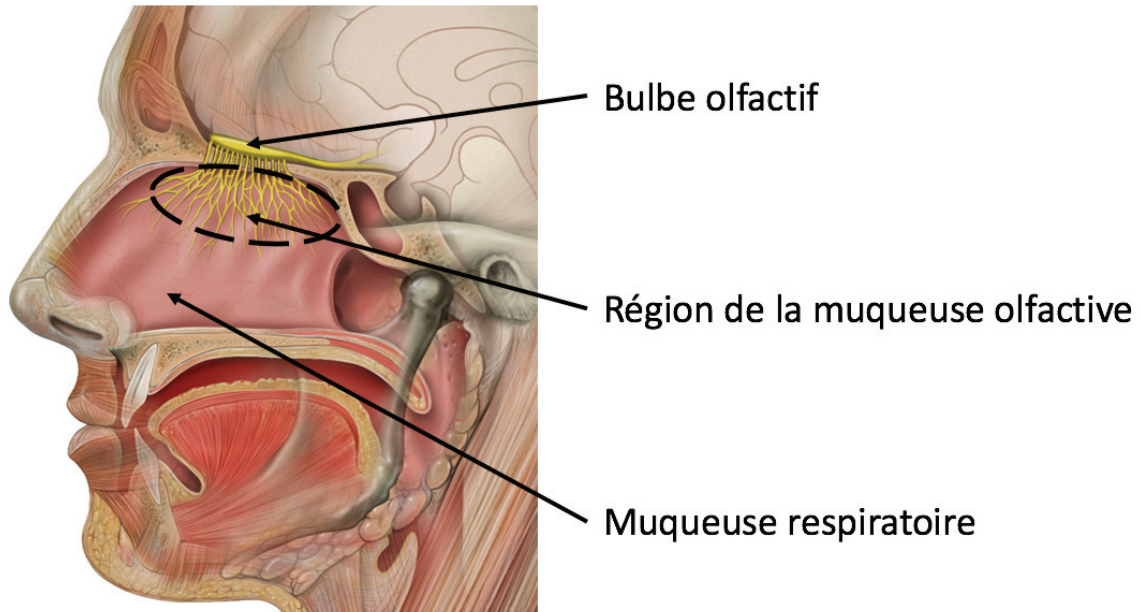


Figure 9 : Schéma d'une coupe sagittale médiane de la face montrant le bulbe olfactif intracrânien et la région de la muqueuse olfactive. D'après Head Olfactory Nerve. The Neuro. McGill University.

- la muqueuse respiratoire partout ailleurs. Il faut noter que l'entrée de chaque fosse nasale, appelée région du vestibule nasale, est tapissée de peau sur environ 6 mm, comme en témoignent la présence d'annexes pileuses.

La muqueuse respiratoire nasale est constituée d'un épithélium pseudo-stratifié cilié, comportant des cellules sécrétoires, et d'un chorion développé, richement vascularisé, qui adhère au périoste ou au périchondre sous-jacent. Le réseau vasculaire présent dans le chorion de la muqueuse nasale est très particulier, car il est formé de capillaires à paroi mince, formant un tissu érectile, en particulier dans les cornets inférieurs.

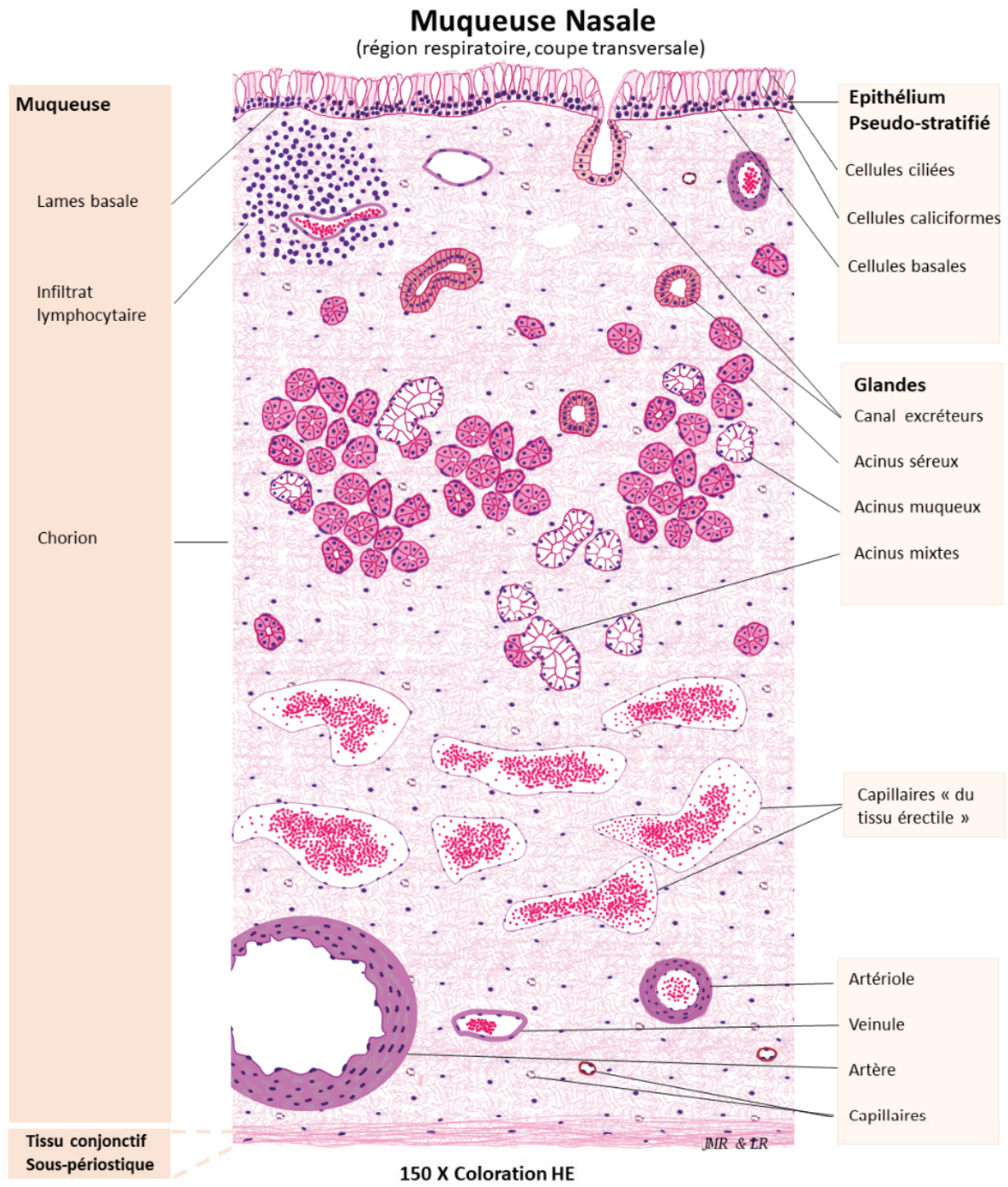


Figure 10 : Schéma de la muqueuse respiratoire nasale en coupe histologique. D'après doc-pedagogie.umontpellier.fr/medecine/histologie (Les fosses nasales et sinus paranasaux).

La muqueuse nasale a des propriétés qui ne sont encore que partiellement connues. Son rôle premier est néanmoins d'appartenir au système de défense de l'organisme.

Le premier verrou est représenté par l'épithélium et le système muco-ciliaire. Le mucus sécrété recouvre la surface de l'épithélium, et joue un rôle de colle pour retenir les particules de l'air inspiré (allergènes, poussières, bactéries, virus...) et les empêcher d'atteindre les poumons. Le mucus chargé de ces particules se déplacent vers l'arrière des fosses nasales, puis tombe dans le pharynx et est ensuite dégluti.

La deuxième ligne de défense est assurée par le système immunitaire annexé à la muqueuse, et les réactions d'inflammation non spécifiques. Il est constitué de tissu lymphoïde situé dans le chorion. La vascularisation locale extrêmement riche permet l'afflux de cellules de l'immunité. La muqueuse a également une fonction de nutrition. Elle tapisse toutes les parois des fosses nasales, principalement osseuses sauf au niveau de la cloison nasale antérieure qui est cartilagineuse. Elle a alors un rôle de nutrition par imbibition du cartilage à travers le périchondre, puisque le cartilage est un tissu avasculaire. Le tissu osseux a également une vascularisation par des vaisseaux pénétrants, et le rôle de la muqueuse nasale est secondaire. Le tissu cartilagineux n'a pas de vascularisation propre et le rôle de la muqueuse est capital au niveau du cartilage de la cloison nasale. La perte de la muqueuse de la cloison nasale, en particulier sur ses deux faces, entraîne une dévascularisation du cartilage, qui conduit à sa nécrose puis sa disparition. Au niveau de la cloison nasale, ce phénomène aboutit à une perforation de la cloison.

La muqueuse nasale est ainsi indispensable à la mise en place de greffons cartilagineux, qui doivent se revasculariser au niveau du site receveur. Elle sera également indispensable pour la nutrition des tissus cartilagineux obtenus par ingénierie tissulaire.

3. Importance de la cloison nasale dans le nez.

Le nez est un organe anatomique très spécifique à l'être humain. Aucun animal ne présente une structure externe semblable à la pyramide nasale. Sa spécificité repose sur une architecture essentiellement cutanée et cartilagineuse qui permet une forme saillante et souple en avant du visage et maintient la perméabilité nécessaire à la respiration nasale. Les différents cartilages du nez ont pour rôle d'éviter l'effondrement de la structure cutanée au moment du flux inspiratoire. Cartilages alaires et triangulaires arment les faces latérales du nez, tandis que le cartilage septal soutient l'ensemble et s'articulent avec les cartilages triangulaires. Le cartilage septal est la pièce maitresse car son absence ou sa destruction entraîne une déformation sévère du nez et une altération majeure de la fonction respiratoire.

Les déformations du septum sont à l'origine de zones de réduction du calibre des fosses nasales, entraînant une obstruction statique. Par ailleurs, le flux inspiratoire nasal crée une dépression intranasale par effet Venturi. Les faces latérales du nez armées par les cartilages alaires et triangulaires, sont normalement conçues pour résister cette dépression intranasale. Malheureusement, les déformations du septum ont pour conséquence une déstabilisation des faces latérales du nez, susceptibles de présenter un collapsus inspiratoire, responsable d'une obstruction nasale dynamique, appelée phénomène de valve nasale. Ainsi, les déformations du cartilage de la cloison nasale ont des conséquences fonctionnelles sur la respiration par plusieurs mécanismes souvent interdépendants.

Les déformations du cartilage septal entraînent également des déformations visibles à l'extérieur du nez, plus graves si elles surviennent tôt dans l'enfance, car le cartilage septal est un des moteurs du développement de la pyramide nasale et de la face.

Ainsi, la forme et la fonction sont intimement liées au niveau nasal.

4. Les problématiques actuelles liées à l'atteinte du cartilage de la cloison.

4.1. Les déformations naturelles ou traumatiques.

Les déviations de la cloison nasale sont très fréquentes et sont l'une des causes de l'obstruction nasale. Elles sont liées à deux étiologies distinctes : par excès de croissance ou par traumatismes.

Déformation par excès de croissance :

Le cartilage septal est un des moteurs de la croissance du nez et de la face, et il entraîne le développement des autres parties du nez. Cependant, il se heurte au développement de la cloison nasale osseuse, d'origine embryonnaire différente et au sens de développement opposé, en créant des déformations d'allure tectonique (Voir le chapitre Embryologie du septum nasal). Par ailleurs, son développement dépasse parfois les capacités de croissance de l'enveloppe cutanée, et le cartilage se déforme en verre de montre ou de façon sigmoïde à l'intérieur du nez, créant des zones étroites responsables d'une chute du débit respiratoire avec obstruction nasale.

Déformation par traumatismes :

Les traumatismes peuvent entraîner des luxations de la cloison cartilagineuse par rapport à la cloison osseuse postérieure ou inférieure, mais sont également la cause de déformation parfois fracturaires de la cloison nasale. Le caractère saillant du nez l'expose particulièrement aux traumatismes, souvent tolérés par le cartilage grâce à ses caractéristiques élastiques. Cependant si sa tolérance est dépassée, le cartilage se fracture, sans capacités de se réparer, et les fractures sont simplement comblées par un tissu fibreux. Les contraintes exercées par la peau sur le cartilage septal entraînent sa déformation car son unité et sa résistance sont altérées par la fracture. Des zones étroites et obstructives se forment. La muqueuse est normale dans ces déformations.

4.2. Les pertes de substances acquises et les destructions du cartilage septal.

Le cartilage septal est nourri par imbibition par la muqueuse qui le recouvre, grâce au chorio et au périchondre. Après un traumatisme, un hématome peut se former entre le cartilage et le périchondre si la muqueuse est complète. S'il ne s'évacue par spontanément, il entraîne une ischémie prolongée du cartilage, qui souffre et se nécrose puis disparaît. Des éléments infectieux peuvent aggraver la destruction du cartilage. Ainsi, l'hématome de la cloison et l'abcès de la cloison sont deux pathologies très graves du cartilage de la cloison, qui peuvent entraîner une destruction du cartilage complète ou partielle, alors que la muqueuse peut être présente en surface. La muqueuse peut aussi parfois souffrir et disparaître en regard de la destruction du cartilage, aboutissant à la perforation de la cloison nasale faisant communiquer les deux fosses nasales. Ces destructions, si elles sont étendues, entraînent un défaut de soutien de la pyramide nasale qui se déforme à l'extérieur. Il n'y a pas de zones d'étranglement dans les fosses nasales, mais l'effondrement du nez déclenche une valve nasale, responsable d'une obstruction nasale (Voir le chapitre Importance de la cloison nasale dans le nez).

La chirurgie de la cloison nasale, appelée septoplastie nasale, est une intervention très fréquente. Elle consiste dans le retrait sous-muqueux des parties cartilagineuses et osseuses responsables de l'obstruction nasale, en laissant théoriquement intacte une quantité suffisante de cartilage pour assurer la conservation de la morphologie et du soutien du nez. Ainsi, cette intervention laisse des zones sans cartilage entre les deux feuillets muqueux. Elle donne souvent de bon résultat, mais peut entraîner une perte de soutien du nez si trop de cartilage est retiré, avec problème de type valve nasale et obstruction respiratoire. La perte du matériau cartilagineux est alors d'origine iatrogène.

Dans d'autres cas, c'est la muqueuse nasale qui est le siège d'une pathologie destructrice, par des maladies inflammatoires qui touchent les capillaires, appelées vascularites. La maladie de Wegener, la maladie de Churg et Strauss sont des maladies auto-immunes qui entraînent des lésions capillaires avec destruction de la muqueuse puis nécrose du cartilage sous-jacent. Les croûtes sont fréquentes, puis font place à des perforations extensives de la cloison cartilagineuse en l'absence de traitement ciblé. Dans ce cas encore, l'obstruction nasale est en rapport avec la perte de soutien du dos du nez et le phénomène de valve nasale, et les turbulences du flux nasal, qui entraînent une perte de charge à la sortie des fosses nasales.

Les cas de réparations du nez en contexte de perte du cartilage septal mais aussi de sa muqueuse sont les plus difficiles, car les techniques de greffes cartilagineuses ne sont pas possibles en l'absence de remplacement de la muqueuse par un tissu vascularisé, capable de servir de support nutritionnel. La réparation des pertes de substance de la muqueuse est techniquement très complexe et doit faire face à un manque de tissu vascularisé disponible.

5. Les réparations actuelles des déficits et pertes de substance de la cloison nasale.

5.1. Le principe du L de Killian.

Les techniques actuelles de septoplastie nasale (chirurgie de la cloison) repose sur le sacrifice de la partie postéro-inférieure de la cloison nasale cartilagineuse et osseuse, souvent responsable des rétrécissements obstructifs statiques(8). Cette zone postéro-inférieure n'a pas de rôle dans le soutien de la pyramide nasale cartilagineuse, et n'a donc pas besoin de reconstruction. Ceci permet d'expliquer pourquoi les perforations postéro-inférieures de la cloison n'ont pas de retentissement sur la forme du nez.

Le soutien de la forme du nez et des cartilages alaires et triangulaires nécessite de laisser en place un fragment de cloison de la forme d'une équerre en position supérieure et antérieure, appelée L de Killian. Toute atteinte de la qualité ou toute perte du cartilage dans cette zone va entraîner un retentissement sur la forme et la fonction du nez.

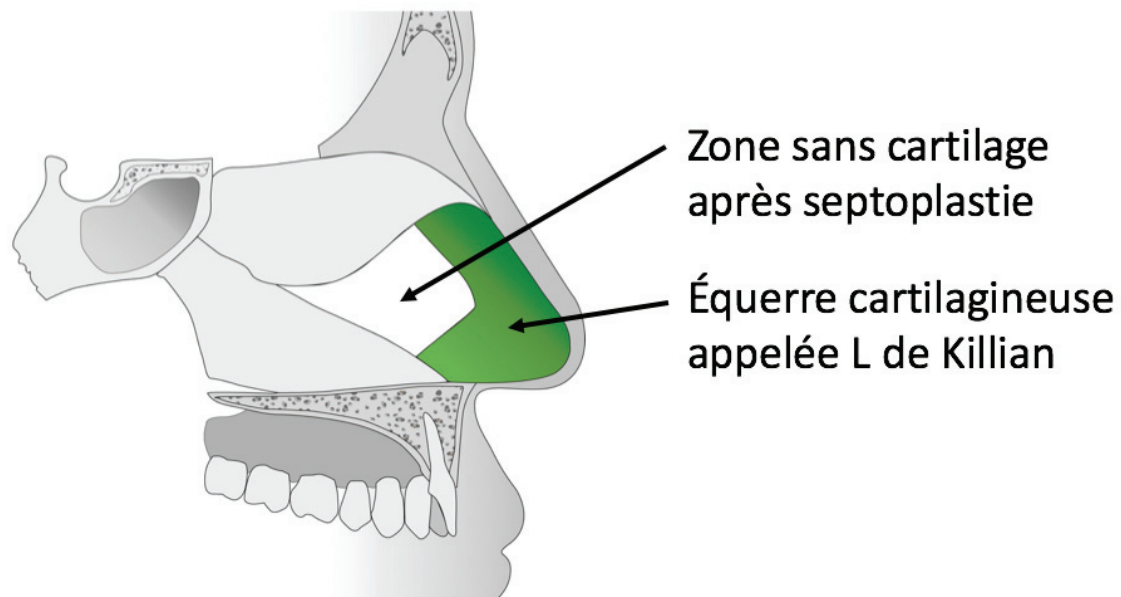


Figure 11 : Schéma illustrant le principe du L de Killian après septoplastie ou réparation de la cloison nasale. (Figure originale Dr Vertu-Ciolino).

Ce principe est à la base de l'élaboration du concept de notre prothèse de cloison nasale. Le tissu cartilagineux obtenu par ingénierie tissulaire doit remplir le rôle mécanique du L de Killian, et reproduire ses rapports anatomiques avec les os de la face et les cartilages alaires et triangulaires.

5.2. Les techniques de greffons structurants.

Quand le cartilage septal résiduel est modérément déficient en qualité au niveau du L de Killian, il est possible de proposer des techniques de renforcement de la structure par des greffons cartilagineux d'apposition pour rigidifier le cartilage résiduel, et lui rendre ses capacités mécaniques nécessaires au maintien de la forme et de la fonction. Les greffons sont le plus souvent prélevés et taillés au niveau de la partie postéro-inférieure destinée à être sacrifiée.

Le cartilage ou les greffons sont couverts par la muqueuse native. Ces greffons sont appelés spreader grafts.

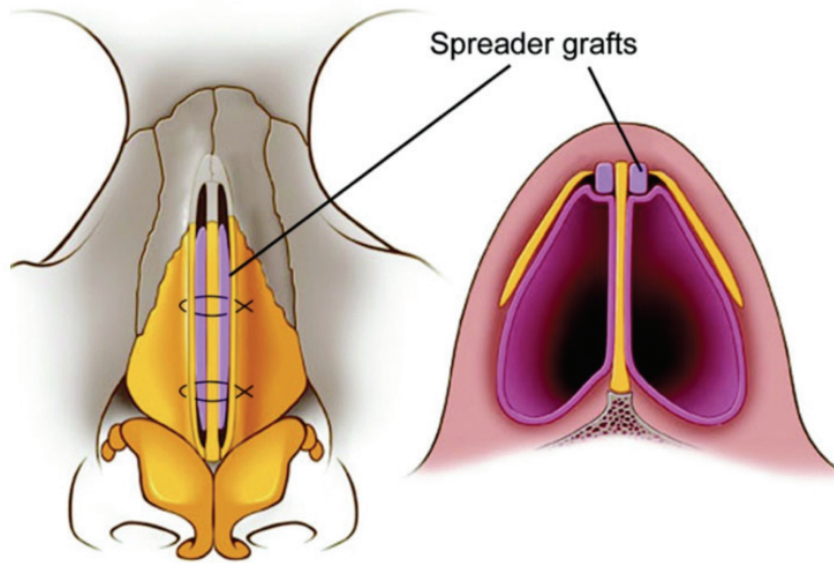


Figure 12 : Schéma illustrant le positionnement de greffons structurants pour reconstituer l'arête nasale. D'après Rohrich et Janis, Techniques in cosmetic surgery, 2004.

5.3. La technique de septoplastie extracorporelle.

Quand le cartilage résiduel de la cloison nasale est largement détruit ou déficient dans la zone du L de Killian, la technique de septoplastie extracorporelle peut être indiquée s'il persiste du cartilage de bonne qualité dans la zone postéro-inférieure(9). Le cartilage persistant est sorti du nez et travaillé sur la table d'opération pour reconstituer une équerre solide qui sera replacée dans la zone du L de Killian. Une pièce principale est additionnée de greffons spreader grafts pour en augmenter la rigidité au niveau de l'arête et reconstituer le rapport anatomique avec les cartilages triangulaires, et d'un greffon modelant pour permettre un emboîtement avec le nez osseux. La nouvelle cloison cartilagineuse est repositionnée dans le nez, de manière à répondre à tous les rapports anatomiques de la cloison native.

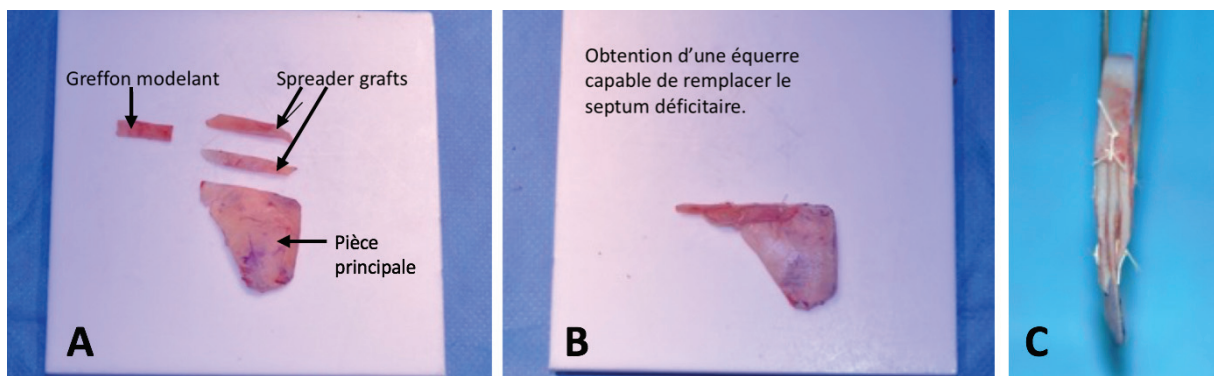


Figure 13 : Construction de la cloison nasale par la technique de septoplastie extracorporelle. A : Les différentes pièces. B : La cloison construite par assemblage en vue de côté. C : La cloison construite en vue de dessus. Photo personnelle Dr Vertu-Ciolino.

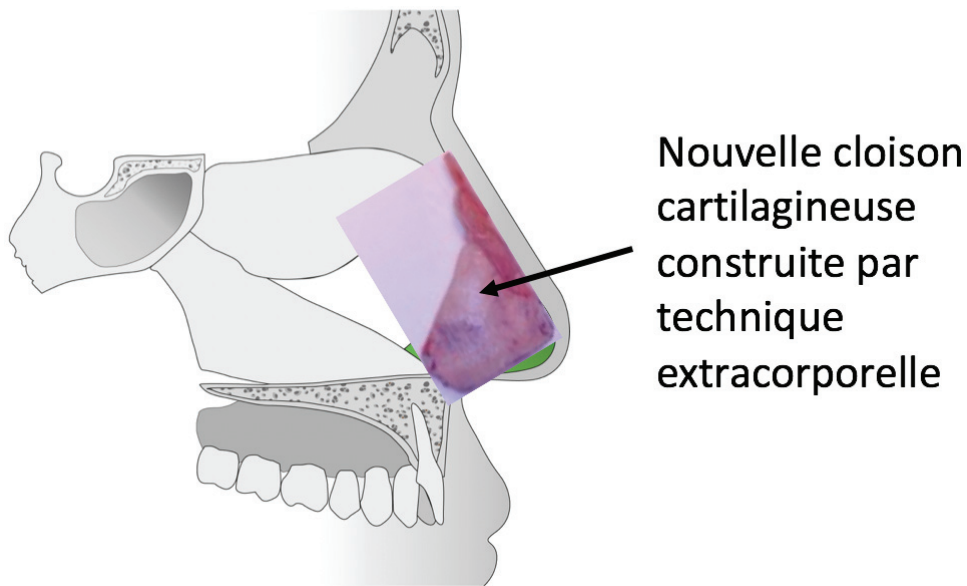


Figure 14 : Illustration du positionnement de la cloison construite par technique extracorporelle dans le nez, en répondant à tous les rapports anatomiques natifs (Dos du nez en haut et maxillaire supérieur en bas). Les cartilages alaires et triangulaires appartiennent aux faces latérales du nez, et sont aussi des rapports anatomiques importants, mais n'apparaissent pas sur ce schéma montrant une coupe sagittale médiane de la face. Figure originale Dr Vertu-Ciolino.

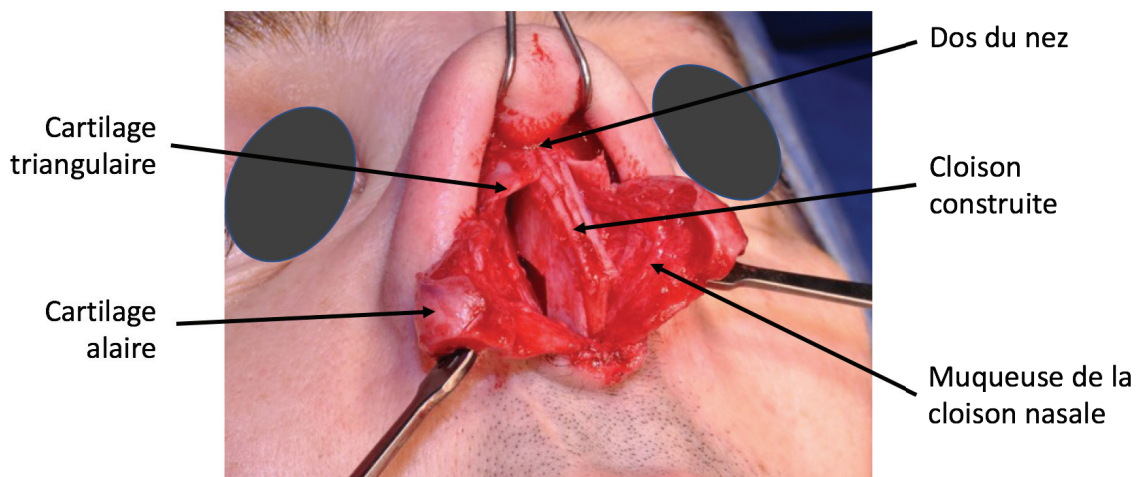


Figure 15 : Photo opératoire de la cloison reconstruite par septoplastie extracorporelle en place, par abord de voie externe (La peau est incisée entre les 2 narines puis réclinée vers le haut). La cloison reconstruite est positionnée dans la zone du L de Killian, et répond aux rapports anatomiques (Dos du nez, cartilages alaires et triangulaires sur les côtés). Photo personnelle Dr Vertu-Ciolino.

5.4. Les greffons structurants de conque ou de côte.

Quand il n'y plus de cartilage nasal résiduel, la structure de la cloison nasale doit être reconstituée avec du cartilage prélevé au niveau des côtes cartilagineuses ou de la conque de l'oreille. Ces sites donneurs permettent le prélèvement de cartilage, avec une rançon considérée comme acceptable mais non négligeable pour le patient. Il s'agit de déformations du thorax ou de l'oreille externe, de cicatrices, et de douleurs qui peuvent devenir chroniques. Ces comorbidités sont difficiles à accepter pour le patient, et représentent un écueil important pour la chirurgie réparatrice.

Le cartilage costal est un cartilage hyalin. Il est abondant mais plus rigide que le cartilage de la cloison. Il doit être taillé pour former des greffons qui permettront de remplacer la zone du L de Killian par assemblage. Il a l'inconvénient de parfois se déformer de façon inattendue en post-opératoire.

Le cartilage de la conque auriculaire est un cartilage élastique. Il est peu abondant et friable, et ne permet pas à lui seul de remplacer la zone du L de Killian, mais peut fournir une partie de la structure.

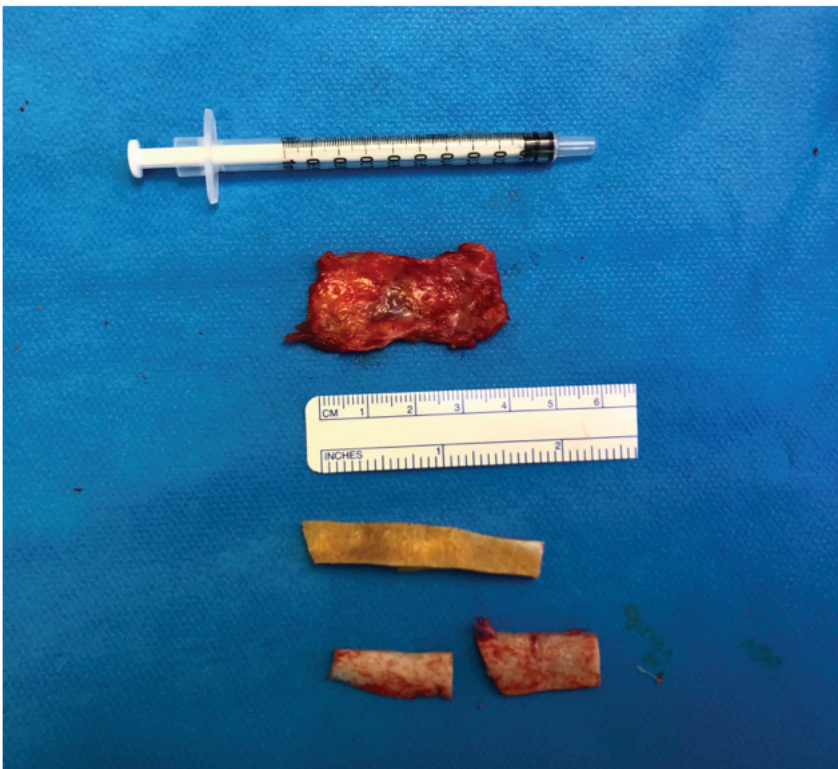


Figure 16 : Photo de fragments de cartilage costal avant taille et assemblage sur la table opératoire. Photo personnelle Dr Vertu-Ciolino.

5.5. Les implants du nez.

Ils n'appartiennent pas à proprement parler aux techniques de reconstruction de la cloison nasale, mais ces implants apparaissent souvent dans les études concernant la chirurgie du nez, et ils ont donné lieu à des recherches en ingénierie tissulaire.

Les implants du nez se sont développés en Asie dans le but d'augmenter la projection du dos du nez pour occidentaliser l'esthétique nasale. Le silicone et le polyéthylène sont les matériaux le plus souvent utilisés dans ce cas, et présentent la caractéristique d'être non-résorbables.

Il s'agit d'implants placés en position sous-cutanée, au-dessus de la structure cartilagineuse. Il n'y a donc pas de remplacement réel de la cloison nasale, qui d'ailleurs n'est pas déficiente dans ces indications. Ces implants n'ont aucun but fonctionnel et n'interviennent pas dans la respiration nasale(10).

Ils sont connus pour avoir beaucoup d'effets indésirables à type d'extrusion, de surinfections et de rejets. Ils font l'objet de recherches dans le domaine de l'ingénierie tissulaire pour augmenter leur tolérance, mais les différents travaux n'évaluent en général pas leur qualité mécanique ou leur apport fonctionnel(5).

Plus récemment, l'acide hyaluronique en gel injectable est venu apporter une nouvelle possibilité de camouflage des petites déformations du dos du nez(11). Il s'agit d'un matériau résorbable, qui ne peut pas remplacer la cloison nasale si elle est déficiente.

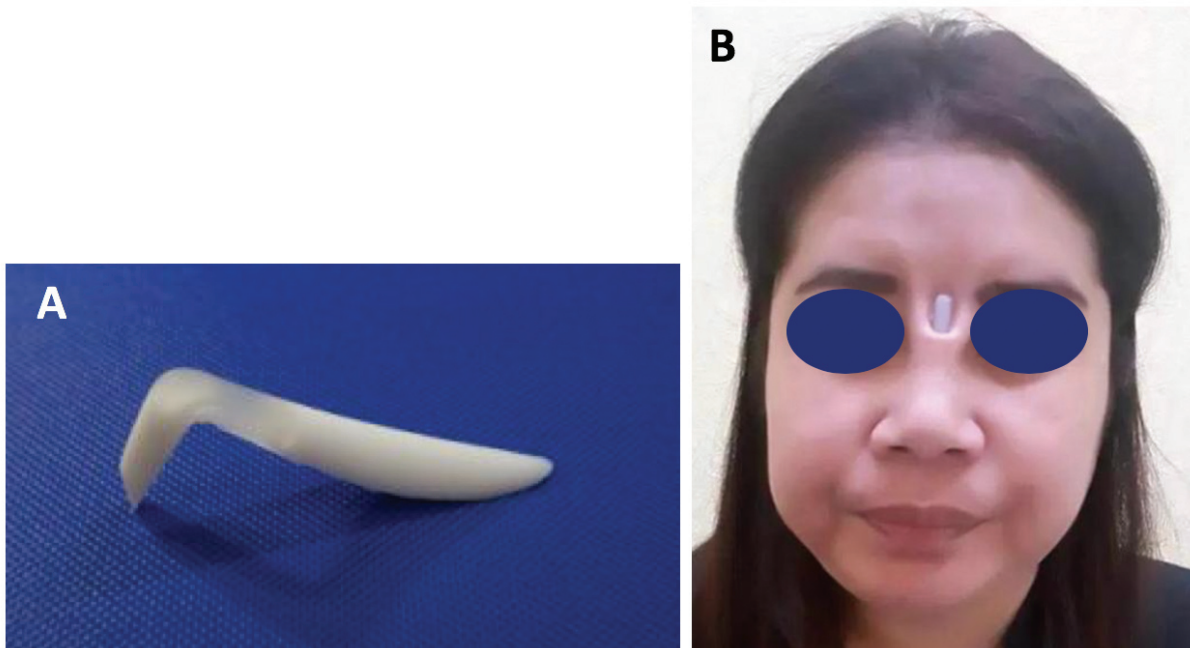


Figure 17 : A : Implant en silicone utilisé pour augmenter le nez. B : Extrusion progressive de l'implant à travers la peau de la racine du nez. L'implant est introduit par une incision à

l'intérieur de la narine, puis inséré dans une pochette disséquée en sous-cutanée, mais la peau peut s'abîmer à divers endroits, jusqu'à entraîner une extrusion.

5.6. Les épithèses nasales.

En cas d'amputation nasale, le déficit tissulaire concerne la structure cartilagineuse mais aussi la peau et la muqueuse. Les réparations chirurgicales sont possibles mais très lourdes, car elles nécessitent plusieurs temps opératoires. Il faut reconstituer le plan de la muqueuse et la structure cartilagineuse puis le revêtement cutané en prélevant des tissus pour lesquels une suppléance artério-veineuse est parfois nécessaire. Les patients reculent parfois devant ce type de procédure, et peuvent alors avoir recours à l'épithèse.

Il s'agit de prothèses amovibles qui remplacent une partie amputée. Elles peuvent être collées chaque jour sur la peau, ou positionnée par aimants ou par des mors sur un ancrage ostéo intégré. Le résultat cosmétique est souvent bluffant. Il peut s'agir d'une solution définitive, ou temporaire en attendant que la reconstruction soit possible, par exemple après radiothérapie.

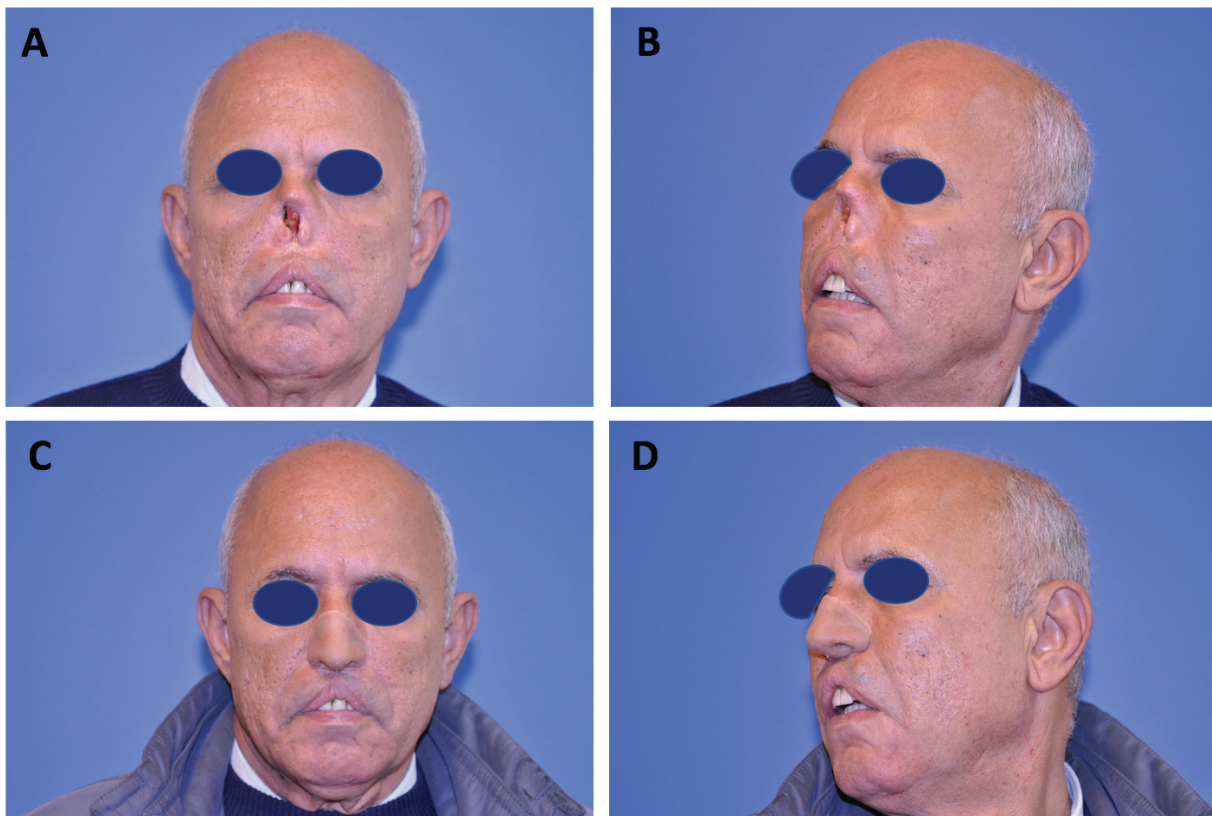


Figure 18 : A, B : Patient amputé de la pyramide nasale suite à l'exérèse d'une tumeur cancéreuse, en vue de face et de 3/4. C, D : Patient équipé d'une épithèse nasale collée en vue de face et de 3/4. Photo personnelle Dr Vertu-Ciolino.

6. État de connaissances en ingénierie tissulaire du cartilage nasal.

Les équipes qui travaillent sur la reconstruction du nez sont très majoritairement tournées vers l'aspect plastique ou esthétique du nez, le plus souvent sans considération respiratoire. Il s'agit en général de fabriquer un tissu susceptible de modifier la forme du nez pour combler un déficit acquis, ou pour augmenter la hauteur du profil. Ce type de demande est très fréquente en Asie, où la tendance est à l'augmentation du nez pour obtenir un nez aux caractéristiques occidentales(10). Le tissu construit est positionné de façon ectopique sous la peau du dos du nez, sans connexion avec le reste de la structure nasale, ni objectifs respiratoires. Le tissu construit doit soulever la peau sans autre rôle mécanique et leurs études ne contiennent que rarement des analyses mécaniques transposables à la reconstruction du septum nasal. D'autres études s'orientent vers la fermeture des perforations de la cloison, avec pour objectif d'améliorer la fonction respiratoire en empêchant les turbulences du flux d'air créées par la perforation dans les fosses nasales(12). Cependant, la fermeture des perforations de cloison ne présente pas d'enjeux mécaniques. Ainsi, les recherches au niveau de l'ingénierie tissulaire pour l'augmentation du dos du nez ou pour la fermeture des perforations étudient des matériaux souvent résorbables pour s'affranchir du risque infectieux sur le long terme(13). Cependant, cette caractéristique laisse supposer qu'il n'y a pas de stabilité des qualités mécaniques du tissu construit dans le temps.

Le but de l'ingénierie tissulaire du cartilage nasale est la fabrication de matériaux biocompatibles avec des propriétés biologiques et mécaniques adaptées à la restauration de la morphologie et de la fonction respiratoire nasale. Le risque de réponse inflammatoire ou immunitaire doit être évalué car il peut mener au rejet de l'implant. Actuellement, la reconstruction du cartilage nasale nécessite l'utilisation d'un support destiné à accueillir les chondrocytes qui doivent être capables de produire une matrice extracellulaire de type cartilagineux. Ces supports sont des biomatériaux, dont la sélection doit répondre à un cahier des charges qui peut varier selon les situations. Le matériau idéal n'existe pas actuellement. Ces biomatériaux peuvent être choisis pour leurs propriétés résorbables ce qui sous-tend leur dégradation progressive, avec remplacement par une matrice extracellulaire néo synthétisée. Le caractère résorbable du bio matériau améliore l'intégration du tissu construit dans les tissus natifs. Inversement, un matériau non résorbable peut-être privilégié pour sa stabilité à maintenir l'intégrité structurelle, la forme et la résistance mécanique du tissu construit sur le long terme.

Notre étude se distingue par l'importance donnée aux qualités mécaniques du tissu construit pour reproduire le cartilage de septum nasal, et donc par l'utilisation d'un scaffold non résorbable.

Les challenges de l'ingénierie tissulaire du cartilage nasal.

L'ingénierie tissulaire essaie de développer des matériaux capables de recevoir des cellules vivantes pour imiter le tissu sain. Ses potentielles applications dans la chirurgie réparatrice sont immenses. La particularité de l'ingénierie tissulaire du cartilage est liée à l'importance des qualités mécaniques du tissu construit. En effet, le cartilage nasal appartient au squelette nasal qui est ostéocartilagineux. Cependant, la partie saillante et projetée de la pyramide nasale, si spécifique du nez humain, possède un squelette exclusivement cartilagineux. Le cartilage septal est l'élément clé du squelette cartilagineux nasal. En effet, son rôle est à la fois morphologique et respiratoire car la forme et la fonction sont intimement liées au niveau du nez. Le septum cartilagineux soulève la voûte cartilagineuse et les ailes du nez, qui doivent rester en tension lors de l'inspiration nasale pour éviter l'effondrement des tissus. Ainsi, une morphologie nasale harmonieuse est nécessaire à une fonction respiratoire normale, mais elle ne suffit pas à elle seule. Inversement, une déformation de la pyramide nasale se traduit toujours par une dégradation de la perméabilité nasale.

Le cartilage septal est formé de cartilage hyalin, qui est un tissu caractérisé par une densité cellulaire très faible avec une matrice extracellulaire très abondante, représentant environ 99 % du tissu. Cette matrice extracellulaire est composée de collagène de type II, glycosaminoglycanes et agrécanes(14)(15). Elle est également fortement hydratée, ce qui lui confère des caractéristiques histologiques et mécaniques uniques. Ainsi, l'abondance et la qualité de la matrice extracellulaire sécrétée par les chondrocytes un rôle absolument essentiel dans le cartilage nasal. Actuellement l'ingénierie tissulaire du cartilage n'est pas parvenue à obtenir une matrice extracellulaire spontanément organisée et permettant de reproduire propriétés mécaniques du cartilage natif. Les chondrocytes doivent bénéficier d'un support pour s'organiser en tissu par la fabrication progressive d'une matrice extracellulaire de type cartilagineux.

La particularité du cartilage septal réside dans sa grande rigidité et son élasticité plus faible que celle des cartilages alaires ou auriculaires(16). Cette rigidité permet la stabilité de la forme, qui doit permettre le maintien en suspension de l'auvent nasal cutané et cartilagineux formé par la

peau et les cartilages alaires et triangulaires. Son élasticité permet d'éviter la fracture du cartilage liée à des traumatismes mineurs, et améliore la tolérance de la peau du dos du nez. Les propriétés mécaniques cartilage septal ont déjà été étudiées et le module d'élasticité du septum nasal sont de l'ordre de 1 à 2 MPa. Le comportement élastique du cartilage septal n'est pas linéaire ce qui entraîne des possibilités de fracture si la force appliquée sur le cartilage est trop élevée(17). Malheureusement, le cartilage n'a pas de capacité de régénération intrinsèque et le septum nasal ne retrouve pas ses propriétés mécaniques globales après une fracture. Ainsi, un des challenges de l'ingénierie tissulaire du cartilage est de développer un tissu artificiel qui imite les caractéristiques mécaniques du cartilage natif. Ces caractéristiques mécaniques sont une clé pour redonner au nez sa forme et sa fonction respiratoire(18).

Un autre obstacle est le caractère unique du nez humain par sa protrusion la structure cutanéocartilagineuse, rendant impossible la modélisation de son positionnement anatomique dans des modèles animaux. L'implantation de la prothèse en sous-cutané chez l'animal permet de mimer le frottement de la peau, mais sans reproduire le positionnement de la cloison nasale, qui est anatomiquement perpendiculaire à la rétraction cutanée. Ainsi, l'étude sur l'animal ne permettra aux chercheurs que d'étudier l'évolution du tissu construit dans un organisme vivant, mais sans le mettre dans des conditions anatomiques. Ceci empêche l'évaluation de la morphologie et de la fonction de la prothèse sur le long terme in vivo.

Cependant, on connaît le comportement des implants actuellement utilisés dans le nez, comme le silicone ou le polyéthylène. Ils sont utilisés pour l'augmentation du dos du nez, souvent en Asie, car la mode est à l'augmentation de la pyramide nasale car les nez asiatiques sont généralement caractérisés par une faible projection du profil. Ces prothèses sont placées sous la peau du nez, au-dessus du squelette ostéocartilagineux nasal, dans une position non anatomique. Malheureusement, le taux d'infection et d'extrusion spontanée est élevé, probablement favorisé par la finesse du tégument recouvrant ces prothèses du côté cutané ou muqueux, et la fréquence des traumatismes et microtraumatismes de la pyramide nasale (due au mouchage, grattage, habillage, sport...)(19). Un matériau synthétique surinfecté ne peut être débarrassé de ses germes et doit être retiré. Il est donc essentiel qu'un matériau synthétique placé dans le nez soit recouvert d'un tissu biologique, semblable à la muqueuse nasale, pour l'isoler des agents pathogènes. Immédiatement après la chirurgie, les propriétés mécaniques doivent être adéquates pour donner un résultat fonctionnel et résister à la rétraction de la peau et des cicatrices.

Conception de biomatériaux pour l'ingénierie du cartilage nasal.

L'un des principaux défis des biomatériaux utilisés en ingénierie du cartilage est de fournir un environnement capable d'accueillir des cellules et de favoriser la sécrétion de la matrice extracellulaire (MEC), pour constituer à terme un tissu cartilagineux. Les chondrocytes humains sont obtenus à partir de cartilage nasal ou articulaire ou de cellules souches mésenchymateuses, selon des protocoles bien établis d'amplification et de différenciation vers la lignée chondrocytaire(20). Généralement, les chondrocytes obtenus par extraction à partir de résidus opératoires, sont amplifiés *in vitro* à l'aide d'un cocktail de facteurs de croissance. Alternativement, les cellules souches mésenchymateuses peuvent être privilégiées pour leur nature proliférative et leur polyvalence. Les cellules sont ensuite redifférenciées vers la lignée des chondrocytes à l'aide de facteurs de croissance incluant le BMP-2, l'Insuline et la Triiodothyronine (21). La stabilisation du phénotype chondrocytaire et donc la production de MEC par les chondrocytes sont favorisées par un environnement tridimensionnel (7), les cellules sont préférentiellement cultivées dans un hydrogel pour produire un tissu de type cartilage. Cependant, les hydrogels utilisés seuls ne sont pas capables de procurer la rigidité nécessaire pour supporter les charges mécaniques supportées par le septum nasal natif. En revanche, un support de structure poreuse de forme définie peut être utilisé pour fournir des propriétés mécaniques biomimétiques. Ce support peut être utilisé comme cadre pour l'hydrogel pour reproduire la forme de la cloison nasale native (22)(23)(24).

Le rôle de ce support est triple.

D'une part, il permet l'intégrité structurelle de l'hydrogel contenant les chondrocytes dans les zones exposées aux charges mécaniques. Pour la reconstruction nasale, il s'agit d'empêcher l'effondrement de l'hydrogel sous les contraintes imposées par la peau nasale sus-jacente (6). L'ancrage de l'hydrogel au support peut être optimisée par exemple en utilisant une structure en mailles ou avec des pores.

D'autre part, le support détermine la forme et le volume du tissu reconstruit. Les dimensions peuvent être facilement adaptées si l'impression 3D est utilisée pour produire le support, pour permettre une personnalisation spécifique au patient.

Enfin, le support doit fournir des propriétés mécaniques capable d'imiter celles du septum natif. Dans la littérature, les matériaux résorbables les plus courants pour l'ingénierie tissulaire du cartilage nasal sont le polycaprolactone (PCL), suivi de l'acide L-poly lactique (PLA) et de la gélatine-méthacrylamide (25). Cependant, il est difficile de prédire la vitesse de résorption du matériau *in vivo*, car elle dépend de sa densité et des conditions biologiques locales.

Les matériaux non résorbables les plus courants en chirurgie nasale sont le silicone, le polytétrafluoroéthylène étiré (Goretex) et le polyéthylène poreux (Medpor). Il a été démontré que ces matériaux sont biocompatibles et non toxiques, cependant, leur taux de rejet et de surinfection dans le nez n'est pas négligeable (5).

Les supports combinant des matériaux résorbables et non résorbables constituent une approche prometteuse. Par exemple, le PCL a été mélangé au graphène, qui est un matériau biocompatible non résorbable, poreux et élastique, et doté de caractéristiques antibactériennes (23). Dans tous les cas, les matériaux utilisés doivent être de qualité médicale.

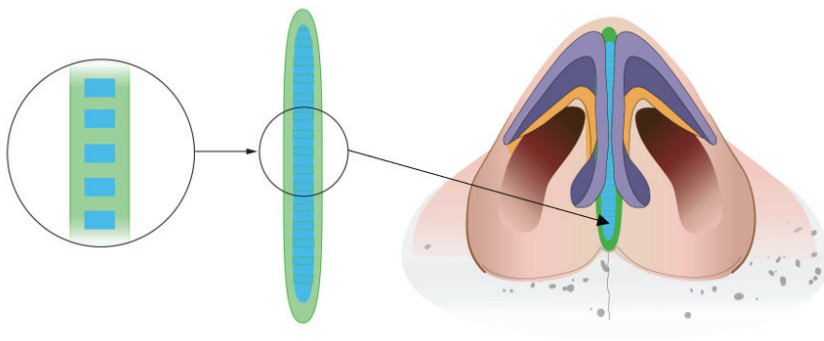


Figure 19 : Illustration schématique d'une prothèse de cloison nasale formée d'un scaffold de structure poreuse (en bleu) recouvert d'un hydrogel de chondrocytes (vert). Le construit est implanté en position anatomique pour remplacer la cloison nasale déficiente. Le scaffold détermine les propriétés mécaniques et la forme du construit, tandis que l'hydrogel fournit un environnement tridimensionnel pour les chondrocytes. Figure originale Dr Vertu-Ciolino.

Évaluations mécaniques dans l'ingénierie du cartilage septal :

Jusqu'à présent, les procédures d'augmentation du dos du nez utilisent des implants non résorbables tels que le Medpor, le Goretex ou le silicone, et les implants sont positionnés de manière ectopique sous la peau du nez. Les résultats esthétiques et les complications sont évalués rétrospectivement après une rhinoplastie d'augmentation(5). Le taux de rejet et l'évolution défavorable de la capsule autour de l'implant sont connus pour être très élevés, notamment avec le Medpor. La qualité de la peau au-dessus de l'implant est évalué cliniquement, mais, il n'y a pas d'analyse mécanique, car ces implants n'ont pas été placés avec des objectifs structurels. La possibilité d'utiliser ces implants à des fins fonctionnelles reste totalement ignorée.

Des recherches ont débuté en ingénierie tissulaire, utilisant des supports en PCL et des cellules souches humaines dérivées du tissu adipeux, pour réaliser des implants de rhinoplastie avec une

meilleure tolérance (22). Aucune étude mécanique n'est conduite, et cette étude admet que des changements de la forme de l'implant peuvent se produire dans le temps avec la dégradation du PCL. Le PCL a été testé en position orthotopique dans une poche septale (26), mais seulement pour l'évaluation de la biocompatibilité, et aucune étude mécanique n'a été faite. La biocompatibilité in vitro du PCL avec des chondrocytes nasaux humains a été étudiée, mais sur une très courte durée, et sans aucune donnée mécanique (27). Nous avons trouvé un exemple unique d'implantation de tissu cartilagineux artificiel pour la restauration du lobule alaire après excision d'un cancer de la peau, décrit comme un premier essai chez l'homme. Des chondrocytes autologues ont été cultivés sur des membranes de collagène, et implantés comme support sous la reconstruction cutanée. Ils ont obtenu de bons résultats morphologiques et fonctionnels, mais aucune matrice cartilagineuse n'a été trouvée sur les biopsies après 6 mois. Des études mécaniques sur les implants de cartilage artificiel n'ont pas été réalisées (28).

Une revue récente sur la reconstruction du cartilage nasal mentionne 2 études qui travaillent sur l'implantation orthotopique de tissu artificiel, en position anatomique dans le nez. Cependant, la première étude n'a testé que la biocompatibilité du PCL le long de la cloison nasale chez des lapins blancs de Nouvelle-Zélande(26). Les implants en PCL ont été prélevés après 4, 8 et 12 semaines pour une évaluation morphologique brute et un examen histologique, sans étude mécanique pour suivre l'évolution de ce matériau résorbable. La seconde étude s'avère en fait être une étude in vitro sans évaluation orthotopique, ni évaluation mécanique(27). Après la biocompatibilité, nous pensons qu'un positionnement orthotopique devrait évaluer la capacité d'un implant à jouer un rôle structurel dans le nez. Mais le manque de modèle animal pour le nez humain est un problème, et certaines investigations mécaniques devraient être faites sur des cadavres. La question principale est moins la tolérance cutanée que la capacité à maintenir la forme du nez et la perméabilité des voies respiratoires nasales.

Néanmoins, la valeur mécanique du cartilage obtenu par ingénierie tissulaire est une préoccupation croissante. Certaines études se concentrent sur les caractéristiques mécaniques du support, et évaluent la procédure d'impression 3D pour modifier le module d'Young du biomatériau (29)(30). La biocompatibilité des biomatériaux est également testée, in vitro avec des chondrocytes d'oreille de chèvre ou du condyle de mouton (31)(24) et in vivo avec des chondrocytes humains (32).

Les mesures biochimiques et histologiques montrent le développement d'une matrice extracellulaire cartilagineuse. Des évaluations de l'évolution mécanique du tissu artificiel sont effectuées, mais la durée des études ne dépasse pas 8 semaines. Certains biomatériaux comme les polymères naturels ne présentent pas les qualités requises car leur temps de résorption est

trop court (31). Les travaux sur le PCL sont nombreux, mais ce matériau a un temps de résorption supérieur à 24 mois, et il sera difficile d'avoir des études in vivo suffisamment longues (33).

Certaines équipes ne sont pas convaincues de la pertinence des biomatériaux résorbables dans l'ingénierie tissulaire du cartilage septal, et commencent à travailler avec des matériaux hybrides incluant une partie non résorbable comme le graphène (23)(34). Ces équipes soutiennent l'idée qu'un matériau résorbable ne sera pas suffisamment stable mécaniquement pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

En conclusion, il reste à effectuer des analyses pertinentes pour évaluer la valeur mécanique des substituts de cloison nasale cartilagineuse issus de l'ingénierie tissulaire. La réalisation de ces mesures sur une durée longue pour tester la stabilité tissulaire et mécanique de la prothèse après implantation in vivo est un enjeu essentiel pour des applications en médecine régénérative. L'utilisation d'un support résorbable expose à des variations de la résistance du tissu artificiel au fil du temps, ou nécessite de faire coïncider la maturation du tissu néo-synthétisé avec la résorption du support résorbable. En outre, la réponse macrophagique, qui peut être inflammatoire pendant la résorption, doit être évaluée et la génération potentielle de produits de dégradation doit être surveillée (35). Les matériaux non résorbables ne présentent pas cette problématique de variation de leurs propriétés mécaniques au cours du temps, mais doivent améliorer leur immunotolérance, pour faire face au risque de rejet et de surinfection.

Recherches futures et perspectives :

La recherche sur la conception de biomatériaux pour l'ingénierie du cartilage nasal est en cours. Outre la biocompatibilité, les biomatériaux doivent posséder des propriétés mécaniques qui imitent le septum nasal natif et qui permettent de conserver la forme et les dimensions du cartilage artificiel. Les matériaux résorbables présentent le risque d'avoir des propriétés mécaniques qui changent avec le temps, en raison de leur dégradation in vivo. Cet aspect reste insuffisamment étudié, et nécessitera des évaluations prolongées idéalement basées sur le délai théorique de résorption du matériau. En parallèle, l'inflammation due à la présence de produits de dégradation doit être étudiée.

L'absence de modèle animal pour le nez humain est un obstacle important, et empêche l'évaluation morphologique ou respiratoire des tissus construits placés en position anatomique, et reproduisant les rapports avec les autres cartilages du nez ou la muqueuse nasale. Par conséquent, le passage à la recherche clinique devra se faire sans essai en position anatomique.

7. Apport de l'impression 3D.

Les premiers travaux de l'équipe sur l'ingénierie tissulaire du cartilage nasal datent de 2012, et l'utilisation d'un matériau alloplastique non-résorbable (polyéthylène poreux MEDPOR) avait été retenue pour le scaffold (6). Le MEDPOR existe sous forme d'implants préformés (squelette cartilagineux de l'oreille externe, cartilage alaire du nez, prothèse de menton, etc...), mais aussi sous forme de plaque modelable et découpable pour un implant sur-mesure. Une plaque retaillée aux dimensions du cartilage septal avait été recouverte d'un gel de chondrocytes. Cependant, le MEDPOR est beaucoup trop rigide pour mimer les propriétés mécaniques du septum cartilagineux. Il s'agissait d'une forme commerciale du matériau, dont les caractéristiques ne pouvaient pas être modifiées à dessein.

Ainsi, ce matériau a été abandonné par l'équipe car il ne permettait pas d'atteindre les objectifs mécaniques désirés pour le septum.

Nous avons donc cherché un matériau susceptible de mimer le comportement mécanique du cartilage, et un processus de fabrication agile, capable de fournir rapidement des prototypes évolutifs et à bas coût.

L'impression 3D est une technologie de fabrication qui a beaucoup évolué depuis les années 2010, permettant de répondre à nombre de nos critères, en proposant l'impression de nouveaux matériaux aux qualités mécaniques variables et évolutives. L'équipe de 3d.FAB, pionnière dans l'utilisation de l'impression 3D pour les applications médicales, a alors été associée au projet pour permettre les développements actuels.

L'impression 3D est une technique innovante qui apporte de nombreux avantages dans l'ingénierie tissulaire.

Liberté du design.

L'intérêt de l'impression 3D réside tout d'abord dans la possibilité de réaliser des pièces complexes, éventuellement impossible à réaliser par technique de moulage par injection, ou en fabrication soustractive. Cet aspect est particulièrement important pour la fabrication de scaffold poreux, très utiles pour la colonisation du support par un tissu vivant en ingénierie tissulaire.

Évolutivité du prototypage.

Le développement d'un scaffold en ingénierie tissulaire nécessite plusieurs essais, et plusieurs aller-retours entre l'impression 3D et l'ingénierie tissulaire. La possibilité de faire évoluer simplement les paramètres pour les différentes dimensions, la porosité, la densité du scaffold

est très utile pour enchaîner les essais jusqu'à l'optimisation. Toutes les étapes sont rapides, car la conception est assistée par ordinateur. D'autre part, certains matériaux à imprimer peuvent être additivés pour faire varier leurs propriétés mécaniques. Ainsi, les possibilités de faire varier les paramètres d'impression mais aussi la qualité du matériau à imprimer sont des éléments qui permettent de faire évoluer facilement les prototypes quand des objectifs mécaniques précis sont à atteindre.

Rapidité de production.

Le but final de cette étude est l'application en recherche clinique. La réactivité sera importante pour pouvoir répondre au besoin des patients, et répondre rapidement à une exigence de fabrication compatible avec une prise en charge médicale.

Personnalisation.

À terme, l'exigence de réparation des patients pourra nécessiter de personnaliser la taille du tissu cartilagineux construit. Cette possibilité est inhérente à l'impression 3D, par la rapidité de prototypage et de production, permise par la conception assistée par ordinateur.

La technique d'impression 3D utilisée est en général fonction du matériau imprimé et des contraintes techniques imposées par la forme à imprimée.

L'impression 3D est caractérisée par un processus de fabrication additive par ajout de couches successives élaborées en 2D. Il existe 3 grandes techniques d'impression 3D :

- FDM Filament Deposition Modeling, (Dépôt de filament) qui correspond à une technique d'extrusion. Le matériau est éjecté à travers une buse, sous la forme d'un filament continu déposé sur un plateau d'impression. Les couches successives de dépôt font apparaître petit à petit la structure à construire. Une étape finale peut être nécessaire pour fixer le matériau dans sa forme définitive (polymérisation, apport de chaleur, de lumière...).
- SLA Stereo Lithography Apparatus (Stéréolithographie) : une résine liquide est transformée en matériau solide par l'utilisation d'un laser, grâce au procédé de photopolymérisation.
- SLS Selective Laser Sintering (Frittage sélectif par laser) : un matériau sous forme de poudre polymère est fusionné par laser haute puissance. La poudre non fusionnée pendant l'impression supporte la structure, et ce processus convient aux pièces à géométrie complexe.

Les différentes techniques d'impression 3D sont choisies en fonction du matériau et de la forme recherchée. Dans notre étude, les matériaux ont d'abord été choisis pour leur grade médical. Ensuite, le critère principal suivant était lié aux propriétés mécaniques théoriques du matériau après impression 3D, pour pouvoir atteindre des valeurs mécaniques capables d'imiter le

cartilage natif. Cette contrainte mécanique forte a poussé à choisir un matériau évolutif en prototypage. Certains matériaux peuvent ainsi être additivés avant l'impression pour modifier leur capacité élastique, et ainsi évoluer pendant le prototypage jusqu'à réussir à imiter les propriétés mécaniques du tissu natif.

Enfin, l'expérience du laboratoire 3d.FAB avec les matériaux testés était très importante dans la sélection, puisque des projets antérieurs leur donnent une grande expertise dans le domaine.

8. Article issu de la thèse.

Une partie de cette introduction bibliographique fait l'objet d'une revue (de type "narrative review") prévue pour être soumise au **Journal of Facial Plastic Surgery and Aesthetic Medicine** avant la fin de l'année.

Cette revue est présentée ici, illustrée de figures originales.

Challenges in nasal septum engineering to restore the shape and function of the nose

A review

Delphine Vertu-Ciolino¹, Edwin-Joffrey Courtial², Marielle Padeloup³, Christophe Marquette², Emeline Perrier-Groult⁴, Frédéric Mallein-Gerin³, Jean-Daniel Malcor^{3}*

1. Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, 5, place d'Arsonval, 69003 Lyon
2. 3d.FAB, Univ Lyon, Université Lyon1, CNRS, INSA, CPE-Lyon, ICBMS, UMR 5246, 43, Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France
3. Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, CNRS UMR 5305, University Claude Bernard-Lyon 1 and University of Lyon, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France
4. IRMB, University of Montpellier, INSERM, 34000 Montpellier, France

*Corresponding author: Jean-Daniel Malcor. Email: jean-daniel.malcor@ibcp.fr

Abstract

Importance

The repair of nasal septal cartilage is a key challenge in cosmetic and functional surgery of the nose, as it determines its shape and its respiratory function. Supporting the dorsum of the nose is essential for both the prevention of nasal obstruction and the restoration of the nose structure. Tissue engineering of the nasal cartilage is a promising approach to reproduce the dimensions and mechanical qualities of the septal cartilage and enable the newly formed tissue to be tolerated and protected from infections.

Observations

Most nasal cartilage engineering studies focus on restoring the external aspect of the nose without considering respiratory concerns, and engineered nasal cartilage constructs are often placed under the skin of the nose to reconstruct the shape, with no functional purpose. In addition, few mechanical studies have been conducted on these constructs. When present, mechanical tests were performed either before implantation or after explantation. Engineered cartilage employed for the reconstruction of the nasal septum is either made from a resorbable biomaterial, which is progressively degraded and replaced by extracellular matrix (ECM) produced by local chondrocytes; or non-resorbable biomaterial, which will conserve its initial shape and is not intended to be replaced by neo-synthesized ECM.

Conclusions and Relevance

Tissue engineering techniques should be employed to obtain implants with the same mechanical properties as the native cartilage and a good immunotolerance *in vivo*. The choice of the biomaterial is crucial: a resorbable material will facilitate implant acceptance but lead to variations in mechanical properties during the resorption period, while a non-resorbable scaffold will allow stability of implant rigidity and shape over time, but present a higher risk of rejection. Combining a non-resorbable mainframe with adequate mechanical properties and a biocompatible hydrogel loaded with autologous chondrocytes is a promising strategy. This would ensure the production of an implant with a stable shape over time, while providing a strong immunotolerance and protection against superinfections. Importantly, efforts must be also directed towards determining the rigidity, elasticity and stability of nasal implants, as well as their evolution over time, especially on the long-term following *in vivo* implantation.

Introduction

The notion of health covers a state of physical, mental and social well-being as defined by the World Health Organization (WHO) [1]. Following an accident or a serious illness, patients expect to regain the best possible quality of life, despite the possible after-effects. This includes regaining a self-image that is as close to normal as possible, for the patients' personal well-being as well as their social and professional status. Such concerns are especially relevant for injuries or pathologies affecting the nose, as it is located in the middle of the face and is an important aesthetic marker. Progress in surgery enabled a response to this legitimate demand, with the use of grafts, plastic surgery, but also free flaps [2, 3], and sometimes composite flaps [4]. Nowadays, surgery is increasingly assisted by tissue engineering to avoid harvesting a large amount of material from the patient and morbidity at the donor site [5].

Nasal cartilage engineering involves fabricating biocompatible biomaterials with suitable biological and mechanical properties to restore the aspect and function of the nose, without eliciting immune or inflammatory response that may result in implant rejection. Such biomaterials may be chosen for their resorbable properties, which involves the progressive degradation of the biomaterial accompanied by its replacement by neo-synthesized extracellular matrix (ECM), to improve implant integration within native tissues. Conversely, non-resorbable biomaterials may be favoured for their ability to maintain their structural integrity, shape and architecture on the long-term. This narrative review aims to present the advances, short-comings and promising approaches in biomaterial design for nasal septum tissue engineering.

Anatomy and respiratory function of the nose

The shape of the nose conditions nasal breathing in humans, which is an essential function as exclusive mouth breathing is not suitable on the long term, and nasal permeability is crucial: the nose has a role in filtering, warming and humidifying the air, but it also regulates breathing by secreting mediators to the lungs and brain [6]. The respiratory flow is conditioned by the intrathoracic depression and nasal resistances. These resistances are linked to the static calibre of the nasal cavities (affected by possible deviation of the nasal septum, or the thickness of the nasal mucosa), as well as the capacity of the nose to resist dynamic inspiratory collapse. Indeed, the airflow in the nasal cavity creates a transmural pressure differential which may lead to the collapse of the nasal nostrils. The cartilaginous structure of the nose must resist this collapse to avoid a nasal valve-related obstruction.

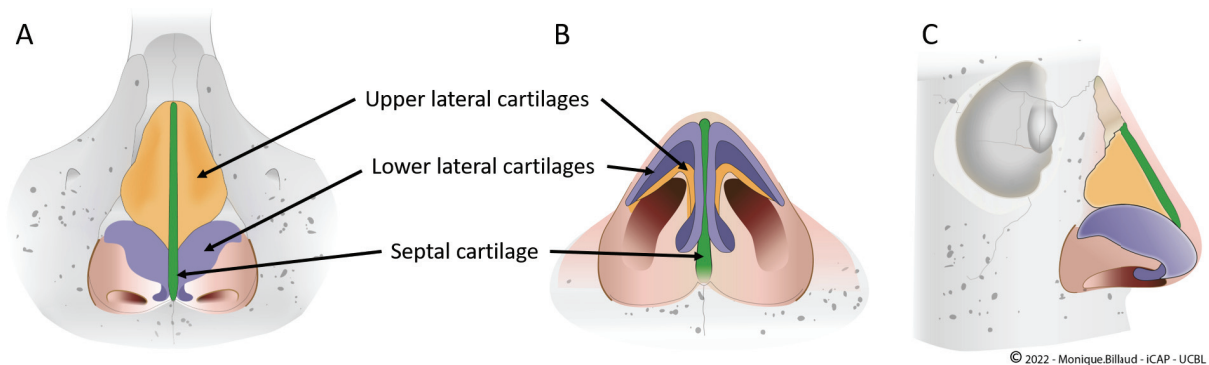


Figure 1. Anatomy of the nose, depicting the upper lateral (yellow), lower lateral (purple) and septal (green) cartilage. A) Frontal view. B) Base view. C) Lateral view.

Thus, the cartilage tissues of the nose have a crucial morphological and mechanical role. On each side, the nose is structured by the upper lateral cartilage located below the nasal bone, and the lower lateral cartilage that determine the shape of the nose, and the opening of the nostrils (Figure1). The septum, in a central position, is structurally the most important cartilage of the nose, because its role is to support upper and lower cartilages, and the overlying nasal skin. The septum maintains sufficient tension to prevent collapse during inspiratory flow.

Cartilage tissue cannot repair itself and a loss of its mechanical properties is permanent. Its weakening or destruction is most often caused by trauma, prone to occur due to the protruding nature of the nasal pyramid. Nasal cartilage loss may also result from cartilage infection (chondritis), or from excessive cartilage resection following nasal septum surgery or

rhinoplasty. The resulting deficiency of septal cartilage can lead to a nasal deformity called saddle nose, as well as nasal obstruction due to the collapse of the nose during inspiration, called the nasal valve phenomenon. As a result, nose shape and function are closely related.

Current surgical techniques and donor site morbidity

To compensate for the deficit or the destruction of the nasal septum (Figure 2A), surgeons usually reconstruct a nasal neo-septum using the L-strut technique (involving a L-shaped support). The reconstructed anatomical structure consists of the L-strut supported on the premaxilla in front and attached to the nasal bones towards the nasal root at the top (Figure 2B). Spreader grafts on each side are added to replicate the lateral sides of the nose, restoring it to its shape and function. Only the necessary fragments of the septum are replaced, and the posterior anatomical portion is not reconstructed, as it has no morphological or functional value. When possible, the L-shaped neo-septum is obtained by using the native cartilage and bone from the septum, in its posterior portion which is less exposed to trauma.

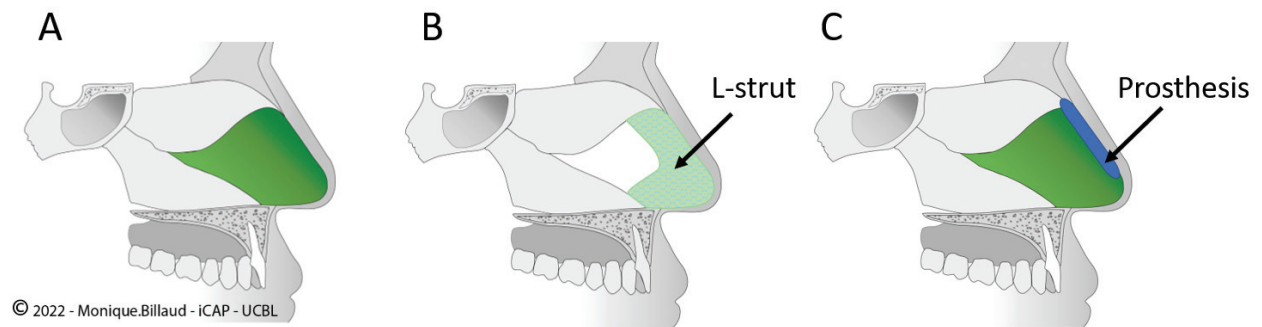


Figure 2. A) Lateral view of the nasal septum cartilage (green). B) L-strut positioning to replace the native septal cartilage (green with blue mesh). C) Prosthesis positioning for nasal dorsum augmentation (blue) on top of the native nasal septum cartilage (green).

If the residual septum is insufficient, cartilage from the auricular concha or the rib is used to make the neo-septum. The autologous cartilage graft is very well accepted in the nose in an anatomical position. An essential element of this surgery is then to cover the cartilage with its mucous membrane, so that the cartilage remains vitalized by imbibition into the mucus.

The choice between the concha and the rib is determined by the amount of cartilage needed. The utilization of ear cartilage presents significant drawbacks: it is insufficient to reconstruct the entire cartilaginous septum ; its removal implies a skin scar, which is often not apparent but is likely to evolve into a hypertrophic or even keloid aspect ; and there is a risk of pain and collateral deformation of the auricle. Conversely, costal cartilage is relatively abundant compared to the dimensions of the nasal septum. Because of its abundance and rigidity, it can

alone replace the entire septum and provide the spreader grafts, but the thoracic scar is visible, and the harvesting site is very painful postoperatively. Complications such as pneumothorax, diaphragmatic hernia, or secondary deformation of the chest wall are also possible. The harvesting of cartilage grafts therefore entails a significant morbidity at the donor site. As a consequence, tissue engineering techniques to fabricate cartilage grafts, free of morbidity resulting from tissue harvesting, have been developed.

Challenges in nasal cartilage engineering

Tissue engineering aims to develop biomaterials that can host live cells to mimic the function of a healthy biological tissue, to repair or replace damaged tissues. As the nasal septum is part of the nasal skeleton, and contributes to the shape and function of the nose, its native mechanical properties must be replicated in biomaterials designed for nose regenerative medicine applications.

The septal cartilage is a hyaline cartilage, a tissue characterized by a very low cell density, with an abundant ECM composed of approximately 99% of type II collagen, glycosaminoglycans and aggrecans [7, 8], resulting in unique histological and mechanical characteristics. The abundance and composition of the ECM secreted by chondrocytes therefore have an essential role in nasal cartilage. The particularity of the septal cartilage resides in its greater rigidity and lower elasticity than that of alar or auricle cartilages [9]. Its stiffness provides shape stability, while its elasticity prevents fracture of the septal cartilage in the event of minor trauma. However, the elastic behaviour of the septal cartilage is non-linear, which results in the possible fracture of the cartilage if stress is too high [10]. Moreover, since this tissue is not vascularized, the cartilage has no regenerative capability and the septum does not regain its overall mechanical characteristics following fracture. Thus, an important challenge in septal cartilage engineering is to develop an artificial tissue that mimics the unique elastic characteristics of human septal cartilage, so as to give the shape and the support to the upper lateral cartilage, while being well-supported by the skin [11]. An additional obstacle is the unique protrusion and very thin cutaneous-cartilaginous character of the nose in humans, making it impossible to model its anatomical positioning in animal models. The implantation of the prosthesis subcutaneously in animals makes it possible to mimic the friction of the skin, but without reproducing the positioning of the nasal septum, which is anatomically perpendicular to the skin retraction. Thus, animal studies will only allow researchers to study the evolution of the

material in a living organism, but not its morphology and function of the prosthesis on the long term *in vivo*.

As an example of a straightforward biomaterial implantation in the nose, silicone prostheses have been used for nasal dorsum augmentation in surgeries aiming to “westernize” the nasal pyramid, a strong demand in Asia where noses are generally characterized by a low projection of the dorsum. These prostheses are positioned under the skin of the nose, above the nasal osteo-cartilaginous skeleton, in a non-anatomical position (Figure 2C). These non-resorbable implants were not subjected to mechanical studies, as their design was not aimed at any mechanical role. Unfortunately, the rate of infection and spontaneous extrusion is high, probably favoured by the thinness of the integument covering these prostheses on the cutaneous or mucous side, and the frequency of trauma and micro-trauma to the nasal pyramid (due to nose blowing, scratching, dressing, sports...) [12].

Over-infected synthetic material cannot be cleared of germs and must be removed. It is therefore useful that a synthetic material placed in the nose is covered with a biological tissue, akin to the nasal mucosa, to isolate it from pathogens. Such a biomaterial should also mimic the imbibition role of the mucous membrane, which supplies the septal cartilage or the new reconstructed tissue with nutrients. The use of an absorbable material could avoid the problems of superinfection and rejection, but the mechanical properties of the constructed tissue may vary over time, and may not yield a functional result and resist to scar and skin retraction immediately after surgery.

Biomaterial design for nasal cartilage engineering

A principal challenge in biomaterial fabrication is to provide an environment for cells and promote the secretion of the ECM by seeded chondrocytes, to eventually constitute a cartilage tissue. Human chondrocytes are obtained by extraction from nasal septum surgery residues or from articular cartilage, expanded *in vitro* using growth factors. Alternatively, mesenchymal stem cells can be preferred for their proliferative nature and versatility, and their potential to undergo chondrogenesis [13]. Cells are then (re)differentiated toward the chondrocyte lineage with a cocktail of growth factors that include Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2) [14] or Transforming Growth Factor-beta 3 (TGF- β 3) [15] and that depend on whether chondrocytes or mesenchymal stem cells are employed. As the stabilization of the chondrocyte phenotype as well as the production of ECM by chondrocytes is favoured by a three-dimensional environment [16], cells are preferentially cultured in a hydrogel to obtain a cartilage-like tissue. Ideally, the hydrogel is progressively replaced by the ECM secreted by chondrocytes. However,

hydrogels widely used in tissue engineering do not possess the suitable rigidity to withstand the mechanical loads supported by the native nasal septum.

To solve this issue, a solid scaffold with a defined structure and architecture, in which a hydrogel can be inserted, may be used to supply biomimetic mechanical properties (Figure 3). This scaffold will constitute a frame for the hydrogel to adopt the shape of the native nasal septum [17-19]. The role of this solid scaffold is threefold:

- 1) - Enabling the structural integrity of the hydrogel containing chondrocytes in areas exposed to mechanical loads. For nasal reconstruction, this involves preventing hydrogel collapse under the strain imposed by the overlying nasal skin. Solid attachment of the hydrogel to the scaffold can be improved by maximizing the contact between the gel and the scaffold, for instance by creating pores in the scaffolds or increasing the hydrophilicity of its surface.
- 2) - Determining the shape and volume of the tissue to be reconstructed. This can be tailored during the scaffold manufacturing step, notably in 3D-printing approaches, to produce patient-specific, personalized biomaterials.
- 3) - Providing the mechanical properties of the hydrogel-scaffold construct, so as to mimic those of the native septum. These can be adjusted for instance by modifying the type, concentration and crosslinking of the building blocks that compose the scaffold.

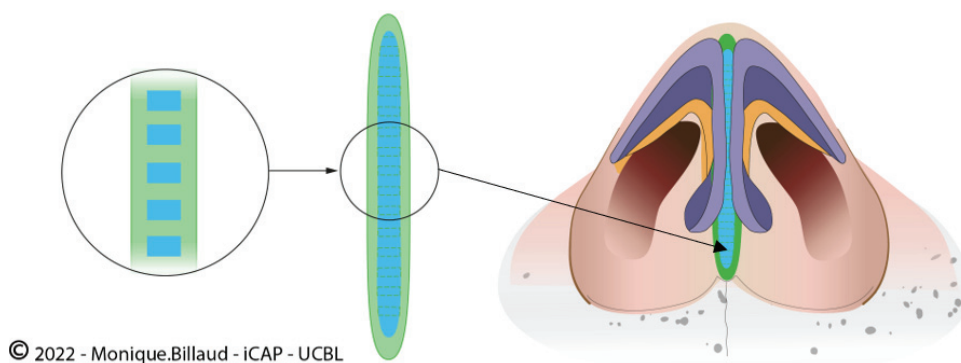


Figure 3. Schematic view of a solid porous scaffold (blue) coated with a hydrogel (green). The scaffold-hydrogel construct may be implanted orthotopically to replace the missing nasal septum. The scaffold determines the mechanical properties and the shape of the biomaterial, while the hydrogel provides the cellular micro-environment.

Mechanical assessments in septal cartilage engineering

The mechanical properties of the nasal cartilage are highly dependent on its ECM composition, notably the collagen to sulphated glycosaminoglycan (GAG) ratio [20]. Decellularized nasal

cartilage may serve as a cellular scaffold, but the decellularization process often decreases the stability and rigidity of the ECM. The mechanical properties can nevertheless be preserved with an adequate protocol [21] or restored by chondrocyte culture over 6 weeks [22].

Unfortunately, efforts in the field of nasal cartilage engineering are primarily oriented towards an aesthetic goal, such as increasing the profile line of the nose in the case of the “westernization” of Asian noses. So far, procedures are using non resorbable material like Medpor (porous polyethylene), Gore-Tex or Silicon, and implants are positioned ectopically under the overlying skin of the nose. These materials are considered biocompatible and non-toxic, however, their rate of rejection and superinfection in the nose is not negligible [23]. Aesthetic results and complications are retrospectively evaluated after augmentation rhinoplasty [24]. Rejection rate and adverse evolution of the capsule around the implant are high, particularly with Medpor [12, 23]. Skin behaviour above the implant is clinically evaluated, but no mechanical analyses were performed since these implants had no structural aim. To this date, the potential of these implants for functional purposes remains overlooked.

In parallel, efforts have been made to produce rhinoplasty implants with a better tolerance, using resorbable materials. In the literature, the most common ones for tissue engineering of nasal cartilage are polycaprolactone (PCL), which has been shown to be biocompatible with human nasal chondrocytes [25], followed by alginate and collagen or gelatin [26]. Although it is difficult to predict the resorption rate of the material *in vivo*, as it will depend on its porosity and on local biological conditions, PCL has been used as scaffold for hydrogels, providing a structural basis for the construct. PCL-scaffolding, for instance, was filled with alginate gels or decellularized cartilage ECM, and loaded with human adipose-derived stem cells [17]. While no mechanical studies were conducted in this case, changes in the shape of the implant *in vivo* may occur over time with the degradation of PCL, according to the authors [17]. PCL combined with alginate also formed 3D-printed biomaterials that boost chondrocyte ECM production and that are stable over 4 weeks following ectopic implantation in mice [27]. Alternatively, alginate can be employed as beads to encapsulate growth factors that enhance type II collagen and GAG production by human chondrocytes [28].

Orthotopic implantation of biomaterial for nasal engineering has been carried out, first along the nasal septum was performed in New Zealand White rabbits. The implants were harvested after 4, 8, and 12 weeks for gross morphological assessment and histological examination, but

without mechanical study to follow the evolution of this resorbable material [29]. Orthotopic implantation was also performed onto the nasal tip of rats. Here, the acellular PLGA/alginate/gelatin composite scaffold was loaded with TGF- β 3 to successfully promote cell homing of stem/progenitor cells from neighbouring tissues, triggering the formation of cartilage tissue in the implanted scaffold [30]. We believe that an orthotopic positioning of an entire engineered nasal septum would help tissue engineers evaluate the capacity of an implant to play a structural role in the nose (and maintain the permeability of the nasal airways), but the lack of animal-model for the human nose is an issue. As an alternative to animal models, mechanical investigations could be conducted in cadavers. Until now, in humans, implantation of engineered nasal cartilage has been performed for alar lobule restoration after skin cancer excision [31]. In this first in-human trial, autologous chondrocytes were cultured on collagen membranes *in vitro*, and implanted as a support under the skin. Good morphological and functional results were obtained, with no adverse effects.

Mechanical properties (along with the biocompatibility) of chondrocyte-laden biomaterials for nasal repair were assessed *in vitro* with chondrocytes from the goat ear [32] or from the sheep condyle [19], and *in vivo* with human chondrocytes [19, 22, 28, 33] (Table 1). For instance, biochemical and histological measurements were performed to investigate the development of a cartilaginous extracellular matrix, followed by its mechanical assessment over 8 weeks following *in vivo* implantation in mice [32]. It is important to note that collagen combined with hyaluronic acid has proven to be unsuitable due to low resorption time and stiffness. By comparison, the resorption time of PCL is estimated to be more than 24 months [34]. Although it is very difficult to carry out *in vivo* studies that span this delay, investigating the evolution of PCL biomaterials on the long term is an essential step before translational procedures in human can be initiated. To circumvent premature biomaterial degradation issues, scaffolds combining both a resorbable and a non-resorbable components offer a promising approach. For example, PCL has been mixed with graphene, a biocompatible porous, elastic and non-resorbable material with antibacterial properties [18]. In addition, 3D-printing procedures were developed to modulate the Young's modulus of PCL-based biomaterial [35]. Further, combination of 3D-printed alginate with cellulose, as well as chondrocytes co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells, showed improved maximum compressive test (possibly due to ECM fabrication, as the lifetime of natural polymers is expected to be short) over 60 days *in vivo* [33]. The studies mentioned in this paragraph as well as their outcomes are summarized in Table 1.

Future research and perspectives

Research on biomaterial design for nasal cartilage engineering is still ongoing. Besides biocompatibility, biomaterials must possess mechanical properties that mimic the native nasal septum and allow the shape and dimensions of the engineered cartilage to be maintained. Overall, sufficient rigidity and stability of tissue-engineered cartilaginous nasal septum substitutes remains to be achieved. Carrying out mechanical measurements over time would contribute to demonstrate the strong potential of biomaterial candidates for nasal septum engineering, notably for resorbable scaffold that may display variations in mechanical resistance over time. In addition, the macrophagic response, which may be inflammatory during resorption, should be assessed and the potential generation of degradation products should be monitored [36]. A thorough understanding of the rate and mechanism of degradation of such a scaffold would allow researchers to finely tune a resorption time that coincides with ECM production by the neo-synthesized tissue. Non resorbable materials are a promising alternative, but immune-tolerance to avoid superinfection and rejection remains an important challenge.

In addition, due to the unique prominence of the human nose, there is no animal model to study the suitability of a biomaterial to maintain an adequate shape *in vivo*, hindering the assessment of the morphological or respiratory evolution of the constructs. Therefore, translational research from biomaterial design to clinical applications for nasal repair will likely occur without animal studies involving artificial cartilage in the anatomic position. Next, the integration of the biomaterial into the native nasal mucosa, the lack of toxicity of the material, and the ability of the engineered construct to withstand trauma and infection in the nose will be crucial in evaluating the clinical applicability of biomaterials designed for nasal septum reconstruction.

Funding

E.P.-G. and C.M. was supported by the “Fondation des Gueules Cassées” (2021) ; D.V.-C. was supported by the “Hospices Civils de Lyon” (2022) ; and F.M.-G. and J.-D.M. were supported by the Prematuration Program of the CNRS (2022).

ARTICLES	Scaffold material Resorbable/ non Resorbable	Cell type	Ectopic / orthotopic positioning of implant	Mechanical tests	Outcome
Kim et al. 2014 [24]	Silicone, Gore-Tex, Medpor. Non-resorbable scaffolds.	Acellular.	Ectopic. Dorsum augmentation by subcutaneous implantation.	No tests were performed.	This retrospective study conducted at a rhinoplasty center in Korea analysed and described superinfection, skin disorders, deformity, and contraction associated with augmentation rhinoplasty with alloplastic materials.
Graham et al. [21] 2016	Decellularized nasal septum cartilage ECM. Resorbable.	HEK293 cells.	<i>In vitro</i> study only.	Tensile Young's modulus.	Mechanical properties of fresh and decellularized nasal cartilage ECM were not significantly different. Decellularized ECM did not show any cytotoxicity and enabled HEK293 proliferation.
Schwartz et al. [22] 2015	Decellularized porcine nasal septum cartilage ECM. Resorbable.	Human nasal chondrocytes.	<i>In vitro</i> study only.	Linear modulus.	Chondrocyte culture in decellularized matrix over 6 weeks increased the linear modulus almost that of native nasal cartilage, and synthesized collagen type II and GAGs.
Yi et al. 2019 [17]	PCL (3D printing) and alginate or decellularized cartilage. Resorbable.	Human adipose-derived stem cells.	Ectopic. Implantation under the skin of nude-mice.	No tests were performed.	No scaffold deformation was observed after 6 and 12 weeks. Encapsulated chondrocytes showed increased <i>Col2</i> , <i>Sox9</i> and <i>ACAN</i> expression, as well type II collagen and aggrecan production, with decellularized cartilage ECM.
Kim et al. 2019 [25]	PCL (3D printing). Resorbable.	Human nasal chondrocytes.	<i>In vitro</i> study only.	No tests were performed.	After 24h, chondrocytes were viable and expressed aggrecan, collagen and Sox9 at the protein level.
Fulco et al. [31]	Collagen membranes. Resorbable.	Human nasal chondrocytes.	Orthotopic. Implantation in humans after tumour excision	No tests were performed.	After 12 months, implants resulted in functional and aesthetically satisfying nasal repair, and no adverse effects were recorded.
Alexander et al. [28] 2010	Alginate beads. Resorbable.	Human nasal chondrocytes.	<i>In vitro</i> study only.	Confined compressive modulus.	Growth factors IGF-1 and GDF-5 enhanced GAG and type II collagen production, as well as confined compressive modulus.
Kundu et al. [27] 2015	PCL-alginate (3D printing). Resorbable.	Human nasal chondrocytes.	Ectopic. Implantation under the skin of nude-mice.	No tests were performed.	PCL-alginate constructs were stable 4 weeks following implantation <i>in vivo</i> and encapsulated chondrocytes synthesized collagen type II and GAGs.
Park et al. 2017 [29]	PCL (3D printing). Resorbable.	Acellular.	Orthotopic. Implantation in New Zealand white rabbits along the native septum.	No tests were performed.	The implant was stable over 3 months, and did not result in unwanted biodistribution or important inflammatory response.
Mendelson et al. [30] 2014	Porous PLGA with alginate and gelatin microspheres. Resorbable.	Acellular.	Orthotopic. Implantation in Sprague Dawley rats onto the nasal tip.	No tests were performed.	TGF- β 3 encapsulated in gelatin microspheres induced homing of stem/progenitor cell from native cartilage and cartilage tissue formation.
Xia et al. 2018 [32]	Hyaluronic acid and collagen (3D printing). Resorbable.	Goat ear cartilage-derived chondrocytes.	Ectopic. Implantation in nude mice and autologous implantation in goat.	Young's modulus, maximum compressive strength.	Collagen-hyaluronic acid constructs were lyophilized to improve their stability and mechanical strength. The resulting scaffolds enabled cartilage ECM production during 8 weeks

Ruiz-Cantu et al. 2020 [19]	PCL and gelatin (3D printing). Resorbable.	Chondrocytes from sheep condyle.	<i>In vitro</i> study only.	Young's modulus.	<i>in vivo</i> . However, scaffold rigidity remains suboptimal for nasal cartilage repair.
Möller et al. 2017 [33]	Nano-fibrillated cellulose and alginate (3D printing). Resorbable.	Human nasal chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells	Ectopic. Implantation subcutaneously in Balb-C mice.	Maximum compressive strength.	Gelatin-PCL constructs supported cell proliferation and cartilage ECM production. However, the rigidity of the constructs remained lower than that of the native septum. Scaffolds maintained their structural integrity 60 days following <i>in vivo</i> implantation. Co-cultures of chondrocytes and bone marrow stem cells showed improved proliferation and type II collagen deposition.
Rajzer et al. 2020 [18]	PCL and graphene (3D printing). Resorbable/Non resorbable.	Human articular cartilage.	<i>In vitro</i> study only.	Mechanical assessment performed on biomaterial sticks used for 3D printing.	Up to 10% graphene improved the mechanical strength of PCL biomaterials. PCL-graphene constructs were biocompatible and supported cartilage ECM production.
Hashimdeen et al. 2016 [35]	PCL (3D printing). Resorbable.	Acellular.	<i>In vitro</i> study only.	Young modulus and crystallinity degree on the scaffold.	Electrohydrodynamic printing was used to fabricate complex PCL-based structures with adjustable mechanical properties.

Table 1. Relevant tissue engineering articles published in peer-review journals investigating the repair of nasal septum using biomaterials.

References

- [1] Constitution of the World Health Organization, 36(11) (1946) 1315-1323.
- [2] C. Barry, P.A. Eadie, J. Russell, Radial forearm free flap for repair of a large nasal septal perforation: a report of a case in a child, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 61(8) (2008) 996-997.
- [3] S. Helman, S. Kadakia, A. Guthrie, M. Mourad, G. Mashkevich, Temporoparietal Fascia Free Flap for Nasoseptal Perforation Repair, 11(3) (2018) 238-241.
- [4] M.K. Aneeshkumar, K. Chueng, R. Hart, J. Trites, M. Taylor, Pivoted composite nasal septal flap for reconstruction of the nose, *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 270(9) (2013) 2445-50.
- [5] L. Lavernia, W.E. Brown, B.J.F. Wong, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, Toward tissue-engineering of nasal cartilages, *Acta Biomater* 88 (2019) 42-56.
- [6] R. Jankowski, D.T. Nguyen, M. Poussel, B. Chenuel, P. Gallet, C. Rumeau, *Sinusology, European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases* 133(4) (2016) 263-8.
- [7] R.J. do Amaral, S. Pedrosa Cda, M.C. Kochem, K.R. Silva, M. Aniceto, C. Claudio-da-Silva, R. Borojevic, L.S. Baptista, Isolation of human nasoseptal chondrogenic cells: a promise for cartilage engineering, *Stem Cell Res* 8(2) (2012) 292-9.
- [8] R.L. Bleys, M. Popko, J.W. De Groot, E.H. Huizing, Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope. II. The perichondrial envelope of the septal and lobular cartilage, *Rhinology* 45(2) (2007) 153-7.
- [9] E.J. Bos, M. Pluemeekers, M. Helder, N. Kuzmin, K. van der Laan, M.L. Groot, G. van Osch, P. van Zuijlen, Structural and Mechanical Comparison of Human Ear, Alar, and Septal Cartilage, *Plastic and reconstructive surgery. Global open* 6(1) (2018) e1610.
- [10] B. Chang, C. Reighard, C. Flanagan, S. Hollister, D. Zopf, Evaluation of human nasal cartilage nonlinear and rate dependent mechanical properties, *Journal of biomechanics* 100 (2020) 109549.
- [11] A. Fertuzinhos, M.A. Teixeira, M.G. Ferreira, R. Fernandes, R. Correia, A.R. Malheiro, P. Flores, A. Zille, N. Dourado, Thermo-Mechanical Behaviour of Human Nasal Cartilage, *Polymers* 12(1) (2020) 177.
- [12] K. Patel, K. Brandstetter, Solid Implants in Facial Plastic Surgery: Potential Complications and How to Prevent Them, *Facial plastic surgery : FPS* 32(5) (2016) 520-31.
- [13] H. Fabre, M. Ducret, O. Degoul, J. Rodriguez, E. Perrier-Groult, E. Aubert-Foucher, M. Padeloup, C. Auxenfans, C. McGuckin, N. Forraz, F. Mallein-Gerin, Characterization of Different Sources of Human MSCs Expanded in Serum-Free Conditions with Quantification of Chondrogenic Induction in 3D, *Stem cells international* 2019 (2019) 2186728.
- [14] A. Dufour, J.E. Lafont, M. Buffier, M. Verset, A. Cohendet, H. Contamin, J. Confais, S. Sankar, M. Rioult, E. Perrier-Groult, F. Mallein-Gerin, Repair of full-thickness articular cartilage defects using IEIK13 self-assembling peptide hydrogel in a non-human primate model, *Scientific reports* 11(1) (2021) 4560-4560.
- [15] K. Na, S. Kim, D.G. Woo, B.K. Sun, H.N. Yang, H.M. Chung, K.H. Park, Synergistic effect of TGFbeta-3 on chondrogenic differentiation of rabbit chondrocytes in thermo-reversible hydrogel constructs blended with hyaluronic acid by in vivo test, *Journal of biotechnology* 128(2) (2007) 412-22.

- [16] A. Dufour, M. Buffier, D. Vertu-Ciolino, F. Disant, F. Mallein-Gerin, E. Perrier-Groult, Combination of bioactive factors and IEIK13 self-assembling peptide hydrogel promotes cartilage matrix production by human nasal chondrocytes, *J Biomed Mater Res A* 107(4) (2019) 893-903.
- [17] H.-G. Yi, Y.-J. Choi, J.W. Jung, J. Jang, T.-H. Song, S. Chae, M. Ahn, T.H. Choi, J.-W. Rhie, D.-W. Cho, Three-dimensional printing of a patient-specific engineered nasal cartilage for augmentative rhinoplasty, *Journal of Tissue Engineering* 10 (2019) 2041731418824797.
- [18] I. Rajzer, A. Kurowska, A. Jabłoński, R. Kwiatkowski, W. Piekarczyk, M.B. Hajduga, J. Kopeć, M. Sidzina, E. Menaszek, Scaffolds modified with graphene as future implants for nasal cartilage, *Journal of Materials Science* 55(9) (2020) 4030-4042.
- [19] L. Ruiz-Cantu, A. Gleadall, C. Faris, J. Segal, K. Shakesheff, J. Yang, Multi-material 3D bioprinting of porous constructs for cartilage regeneration, *Materials Science and Engineering: C* 109 (2020) 110578.
- [20] D. Watson, M.S. Reuther, V.W. Wong, R.L. Sah, K. Masuda, K.K. Briggs, Effect of hyaluronidase on tissue-engineered human septal cartilage, *The Laryngoscope* 126(9) (2016) 1984-9.
- [21] M.E. Graham, P.F. Gratzner, M. Bezuhyly, P. Hong, Development and characterization of decellularized human nasoseptal cartilage matrix for use in tissue engineering, *The Laryngoscope* 126(10) (2016) 2226-31.
- [22] S. Schwarz, A.F. Elsaesser, L. Koerber, E. Goldberg-Bockhorn, A.M. Seitz, C. Bermueller, L. Dürselen, A. Ignatius, R. Breiter, N. Rotter, Processed xenogenic cartilage as innovative biomatrix for cartilage tissue engineering: effects on chondrocyte differentiation and function, *J Tissue Eng Regen Med* 9(12) (2015) E239-E251.
- [23] K. Stelter, S. Strieth, A. Berghaus, Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks, *Rhinology* 45(4) (2007) 325-31.
- [24] H.S. Kim, S.S. Park, M.H. Kim, M.S. Kim, S.K. Kim, K.C. Lee, Problems associated with alloplastic materials in rhinoplasty, *Yonsei medical journal* 55(6) (2014) 1617-23.
- [25] D.H. Kim, M.H. Lim, J.H. Jeun, S.H. Park, W. Lee, S.H. Park, M.Y. Kwon, S.H. Hwang, S.W. Kim, Evaluation of Polycaprolactone-Associated Human Nasal Chondrocytes as a Therapeutic Agent for Cartilage Repair, *Tissue engineering and regenerative medicine* 16(6) (2019) 605-614.
- [26] C.M. Chiesa-Estomba, A. Aiastui, I. González-Fernández, R. Hernáez-Moya, C. Rodiño, A. Delgado, J.P. Garces, J. Paredes-Puente, J. Aldazabal, X. Altuna, A. Izeta, Three-Dimensional Bioprinting Scaffolding for Nasal Cartilage Defects: A Systematic Review, *Tissue engineering and regenerative medicine* 18(3) (2021) 343-353.
- [27] J. Kundu, J.-H. Shim, J. Jang, S.-W. Kim, D.-W. Cho, An additive manufacturing-based PCL–alginate–chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9(11) (2015) 1286-1297.
- [28] T.H. Alexander, A.B. Sage, A.C. Chen, B.L. Schumacher, E. Shelton, K. Masuda, R.L. Sah, D. Watson, Insulin-like growth factor-I and growth differentiation factor-5 promote the formation of tissue-engineered human nasal septal cartilage, *Tissue engineering. Part C, Methods* 16(5) (2010) 1213-21.
- [29] S.H. Park, B.G. Yun, J.Y. Won, W.S. Yun, J.H. Shim, M.H. Lim, D.H. Kim, S.A. Baek, Y.D. Alahmari, J.H. Jeun, S.H. Hwang, S.W. Kim, New application of three-dimensional printing biomaterial in nasal reconstruction, *The Laryngoscope* 127(5) (2017) 1036-1043.

- [30] A. Mendelson, J.M. Ahn, K. Paluch, M.C. Embree, J.J. Mao, Engineered nasal cartilage by cell homing: a model for augmentative and reconstructive rhinoplasty, *Plast Reconstr Surg* 133(6) (2014) 1344-1353.
- [31] I. Fulco, S. Miot, M.D. Haug, A. Barbero, A. Wixmerten, S. Feliciano, F. Wolf, G. Jundt, A. Marsano, J. Farhadi, M. Heberer, M. Jakob, D.J. Schaefer, I. Martin, Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial, *Lancet (London, England)* 384(9940) (2014) 337-46.
- [32] H. Xia, D. Zhao, H. Zhu, Y. Hua, K. Xiao, Y. Xu, Y. Liu, W. Chen, Y. Liu, W. Zhang, W. Liu, S. Tang, Y. Cao, X. Wang, H.H. Chen, G. Zhou, Lyophilized Scaffolds Fabricated from 3D-Printed Photocurable Natural Hydrogel for Cartilage Regeneration, *ACS applied materials & interfaces* 10(37) (2018) 31704-31715.
- [33] T. Möller, M. Amoroso, D. Hägg, C. Brantsing, N. Rotter, P. Apelgren, A. Lindahl, L. Kölby, P. Gatenholm, In Vivo Chondrogenesis in 3D Bioprinted Human Cell-laden Hydrogel Constructs, *Plastic and reconstructive surgery. Global open* 5(2) (2017) e1227.
- [34] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, P. Wang, The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant, *Biomaterials* 27(9) (2006) 1735-1740.
- [35] S.H. Hashimdeen, R. Thorogate, M. Miodownik, M.J. Edirisinghe, Fabrication of bespoke nasal septal scaffolds, *Materials & Design* 90 (2016) 403-409.
- [36] Y. Cao, S. Sang, Y. An, C. Xiang, Y. Li, Y. Zhen, Progress of 3D Printing Techniques for Nasal Cartilage Regeneration, *Aesthetic plastic surgery* 46(2) (2022) 947-964.

Objectif de l'étude : Le concept Nasaltis : Fabrication d'une prothèse de septum nasal.

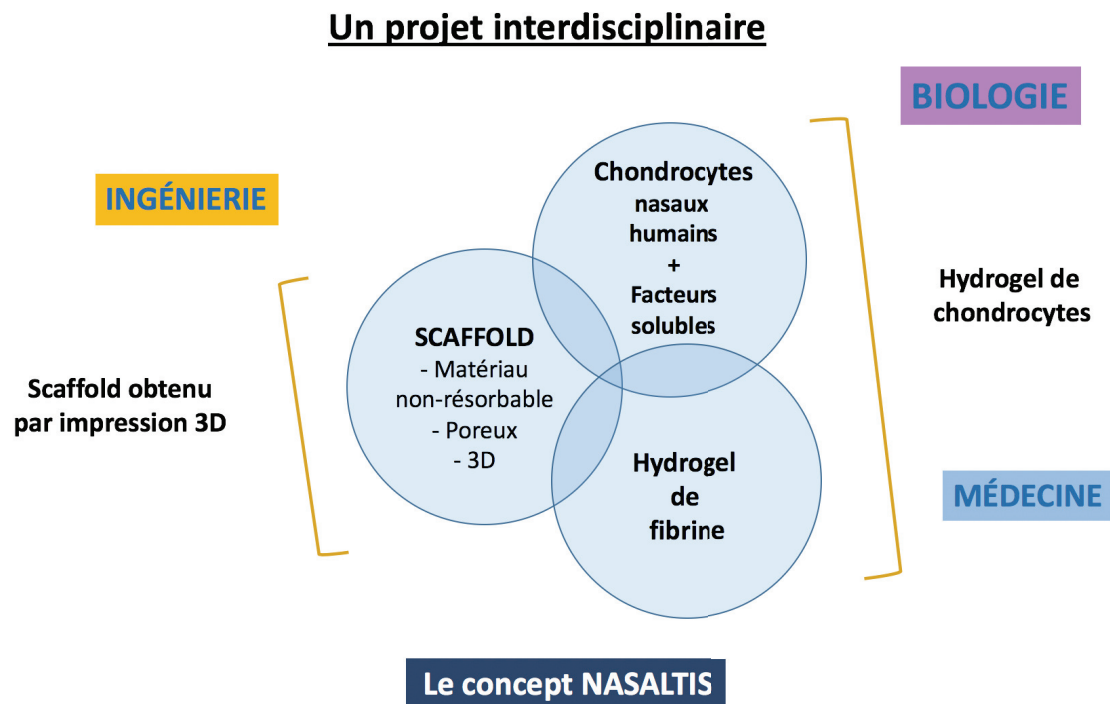


Figure 20 : Schéma de synthèse du concept interdisciplinaire NASALTIS.

Le cartilage septal est la pièce maîtresse de la structure nasale cartilagineuse, car il donne au nez sa forme saillante, si spécifique de l'espèce humaine, et évite l'effondrement des ailes du nez lors de l'inspiration, permettant la respiration nasale.

Les contraintes mécaniques exercées par la peau sur les cartilages alaires et triangulaires et le septum sont très importantes. Après fracture ou destruction du cartilage septal, en fonction de la qualité de la peau, le nez va s'affaisser ou se rétracter. Si la peau est épaisse et lourde, elle va écraser les cartilages alaires et triangulaires vers le bas, alors que si elle est très élastique, elle peut rétracter les cartilages alaires et le nez vers le visage(36). La prothèse de septum nasal doit résister à ces contraintes, de façon immédiate au moment de la chirurgie, ainsi que dans le temps sans variation. Inversement, elle ne doit pas non plus être traumatisante par une excessive rigidité au risque d'abimer le derme voire de créer des plaies puis une exposition.

L'objectif final de notre étude est l'application chez l'homme, donc toutes les étapes ont été envisagées dans un but translationnel. Tous les éléments utilisés pour la production de chaque constituant de la prothèse ont été sélectionnés pour leur caractère médical. Par exemple, un hydrogel de fibrine a été retenu car il existe sous la forme d'une colle biologique utilisée en chirurgie, et les facteurs solubles utilisés pour l'amplification et la culture des chondrocytes sont des médicaments.

Le scaffold doit être parfaitement couvert d'un gel de cartilage pour éviter l'exposition du matériau, qui majore le risque de surinfection. L'interface entre le matériau et le gel de chondrocytes doit permettre une adhésion intime.

Cahier des charges de chaque élément :

Le scaffold a été souhaité dans un matériau non-résorbable de grade médical. Sa structure doit être poreuse pour améliorer l'ancrage du gel au matériau, éviter les phénomènes de cisaillement lors des manipulations et lors de la mise en place en application clinique, et permettre la diffusion transfixiante de l'ensemble des éléments du métabolisme cellulaire.

La porosité peut être obtenue en impression 3D par la technique du dépôt de filament FDM (Filament Deposition Modeling). Le tissage crée des mailles avec des vides. La fabrication additive permet la superposition précise des plans successifs, avec création de puits transfixiants qui traversent la structure. Enfin, le matériau doit être capable de mimer les propriétés mécaniques du septum cartilagineux natif en fonction du prototypage. Cette caractéristique implique des qualités élastiques paramétrables au moment de l'impression 3D. La principale caractéristique du cartilage nasal est de présenter une élasticité importante, pour tolérer les traumatismes liés à son anatomie saillante, et être supporté par la peau sus-jacente.

L'hydrogel de fibrine a été choisi car il existe sous forme d'un dispositif médical avec marquage CE (produit TISSEEL par exemple, utilisé quotidiennement dans les blocs opératoires, avec un coût accessible). Il a pour rôle de créer un environnement tridimensionnel favorable à la redifférenciation des chondrocytes amplifiés (37) et de permettre la diffusion des facteurs solubles nécessaires à la culture des chondrocytes. Il doit être progressivement remplacé par la matrice extracellulaire produite par les chondrocytes, pour laisser place à un gel de cartilage. Il doit permettre un coulage dans un moule autour du scaffold, dans un intervalle de temps bref mais suffisant, avant sa coagulation. Il devient solide pour conserver la forme donnée par le moule, après ouverture. Cela permet sa manipulabilité pour la mise en culture, puis l'application clinique.

Les cellules sont des chondrocytes humains, et seront autologues pour l'application clinique future. Cet impératif nécessitera une technique en 2 temps, avec un premier temps de prélèvement du cartilage résiduel du patient, puis un 2ème temps pour mise en place de la prothèse de septum construite par ingénierie tissulaire, après amplification et culture des chondrocytes autologues in vitro. Le processus d'extraction, d'amplification et de culture des chondrocytes nécessitera l'aide de facteurs solubles agréés dispositif médical CE ou médicament. La qualité du phénotype des chondrocytes doit être vérifiée par la caractérisation de la matrice extracellulaire.

Vérification de l'applicabilité technique et translationnelle du construit obtenu par ingénierie tissulaire :

L'objectif de ce projet interdisciplinaire réunissant biologistes, Ingénieurs, et médecins est l'application en recherche clinique. Ainsi, sont prévus des essais in vivo chez la souris pour vérifier la tolérance cutanée et la résistance du gel de cartilage, et un essai chez le cadavre pour reproduire une chirurgie d'implantation. Cette étape permet de vérifier le maintien de la forme extérieure du nez, et de valider la manipulabilité par le chirurgien sans destruction du tissu construit.

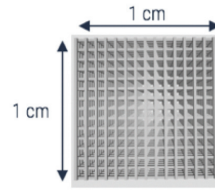
1^{ÈRE} PARTIE

Sélection d'un matériau imprimable et biocompatible à partir de deux matériaux candidats.

POROLAY
/
SILICONE
Médical

Imprimabilité 3D

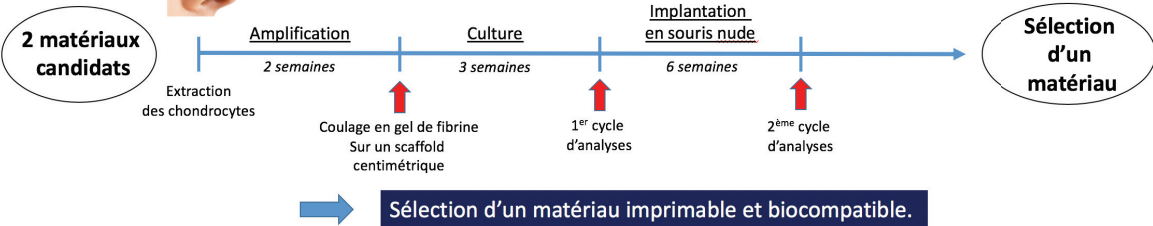
Fidélité de l'impression
Étude en microscopie.



Modélisation
puis impression
de scaffolds
centimétriques.

Biocompatibilité

Extraction / Amplification de chondrocytes humains de septum nasal.
Fabrication d'un gel de chondrocytes.
Culture in vitro du gel de chondrocytes au contact de chaque matériau.
Culture en bioréacteur (souris nude).
→ Live/ Dead, PCR, Western Blot, Microscopie confocale.

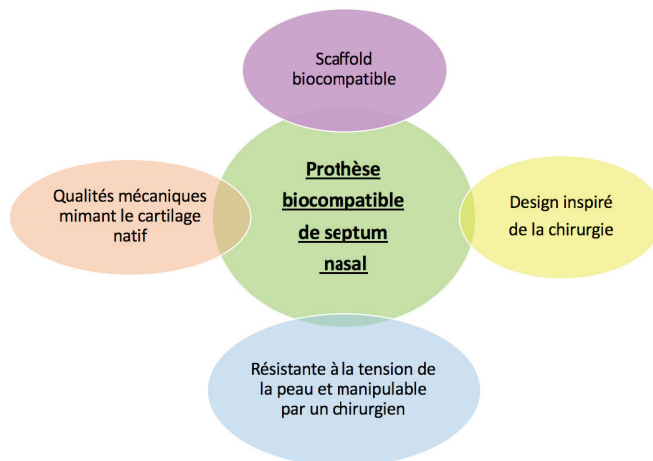


2^{ÈME} PARTIE

Développement d'une prothèse de cartilage nasal de taille réelle associant un scaffold biocompatible et un gel de cartilage.

SCAFFOLD
=
SILICONE
Médical

- ✓ Tests mécaniques sur le septum natif. { Obtenir des objectifs de valeur du module d'Young.
- ✓ Design du scaffold de la prothèse septale et du moule adapté au coulage de gel de chondrocytes. { Imprimabilité.
- ✓ Culture de la prothèse in vitro. { Maintien de la biocompatibilité → Live/ Dead, PCR, Western Blot, Microscopie confocale.
- ✓ Essai de la prothèse chez le cadavre. { Essai en condition de chirurgie.



→ Elaboration d'une prothèse biocompatible de septum nasal par impression 3D et ingénierie tissulaire.

-Matériel et Méthodes.

1. Protocole de collecte des échantillons cartilagineux.

Les échantillons de cartilage septal sont collectés au cours d'une intervention chirurgicale de septoplastie ou rhinoseptoplastie, auprès de donneurs ayant signés un consentement préalable écrit. L'information des donneurs et le protocole de recueil a fait l'objet d'une déclaration de conformité RGPD n° 21_5376.

Notre étude est une Recherche N'impliquant pas la Personne Humaine RNIPH selon la loi Jardé de 2012, déclarée dans la base HCL AGORA sous le numéro 376.

Type d'échantillons et volumes :

Il s'agit de fragments de cartilage nasal récupérés à la fin d'une intervention chirurgicale, et habituellement destinés à être jetés sans analyse.

La chirurgie est menée pour des problèmes respiratoires nasaux (septoplastie et rhinoseptoplastie). Le geste chirurgical n'est pas modifié dans le but du prélèvement. Le patient est informé avant la chirurgie de ce protocole de recherche, et son consentement est recueilli.

Le patient est libre de refuser le don de résidus opératoires.

Chaque prélèvement est de l'ordre de 10 à 100 mm³ et doit être conservé dans un poudrier rempli de sérum physiologique.

Critères d'inclusion des patients :

Tous les patients opérés de septoplastie nasale ou de rhinoseptoplastie peuvent être inclus.

Critères d'exclusion :

Les patients connus porteurs du VIH ou du VHC sont exclus, de même que tous les patients suspects de maladie infectieuse active, ou porteurs d'une pathologie tumorale maligne au moment du prélèvement.

Nombre d'échantillon :

Le nombre de patients prélevés est estimé à environ 10 pour l'étude.

Prestation réalisée :

Les résidus opératoires sont récupérés en fin d'intervention chirurgicale.

Le prélèvement est pseudonymisé. Les informations concernant le sexe et l'âge du patient sont conservées pour transmission au laboratoire.

Les données des patients sont compilées dans un fichier.

Le prélèvement est acheminé au laboratoire LBTI dont l'adresse est située 7 rue du Vercors 69007 Lyon.

Acheminement vers le laboratoire LBTI :

L'encadrement du bloc opératoire planifie le transport des échantillons par taxi.

Les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur en attendant leur transport.

Le transport est réalisé sans urgence dans un délai maximum de 8 jours, et à température ambiante.

Listes des données associées :

Les données transmises au laboratoire LBTI sont le sexe et l'âge du patient.

2. Protocole d'extraction des chondrocytes.

Les fragments de cartilage septal sont lavés avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich), puis découpés en tranches très fines à la lame stérile. Ils subissent ensuite une double digestion par une solution de trypsine 0,2 % (Sigma) diluée dans un mélange 1:1 de DMEM et de Ham's F12 supplémenté avec 50 µg/mL de Streptomycine et 50 U/ml de Pénicilline (Panpharma) pendant 30 mn à 37°C sous agitation, puis une solution de collagénase A clostridiale 0,06 % (Roche Applied Science) pendant une nuit à 37°C sous agitation.

Les fragments digérés sont transvasés dans un nouveau tube flacon à travers un tamis 70µm.

Les chondrocytes obtenus sont centrifugés à 1000 Tr/min pendant 10 mn, remis en suspension dans un mélange 1:1 de DMEM et de Ham's F12 supplémenté de Streptomycine et Pénicilline, additionné de 10% de SVF, puis comptés au Cellometer.

3. Protocole d'amplification des chondrocytes.

Les chondrocytes sont ensemencés avec une densité de $1,5 \times 10^4$ cellules/cm² en milieu de culture (DMEM-F12) supplémenté avec Streptomycine et Pénicilline et 10% de SVF (Gibco-invitrogen). Les cellules sont appelées P0.

Après 48 heures, le milieu est renouvelé et supplémenté avec FGF-2 (5 ng/ml) et Insuline (5 µg/ml). Le mélange de FGF-2 et Insuline est appelé FI. Le milieu de culture supplémenté en FI est renouvelé 3 fois par semaine. Les cellules sont cultivées pendant 15 jours à 37°C avec 5% de CO₂.

4. Protocole de préparation du construit cartilagineux : préparation du gel de fibrine puis du gel de chondrocytes, puis coulage dans le moule sur le scaffold, et culture cellulaire.

Étape préliminaire pour la préparation du gel de fibrine :

On prépare 2 solutions stock tampon d'**Hepes** (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) **10 mM à pH 7,4** et d'**Hepes 10mM + 0,1% BSA à pH 6,5**

On prépare une solution stock de sels à NaCl 3M et CaCl₂ 0,4 M dans 20 ml d'Hepes à pH 7,4.

On prépare la solution stock de thrombine dans le tampon Hepes à pH 6,5, pour une concentration finale de thrombine de 2 U/ml.

On prépare la solution stock de fibrinogène humain à 50 mg/mL dans le tampon Hepes 7,4.

Protocole pour préparer 3 mL de gel de fibrine contenant des chondrocytes pour enrober les paires de scaffolds centimétriques.

Chaque échantillon de cartilage est utilisé pour fabriquer un gel de chondrocytes permettant d'enrober une paire de scaffold centimétrique (un scaffold en polyuréthane Porolay P60 et un scaffold en Silicone MED-4850).

À la fin de l'amplification des chondrocytes, on prépare un culot cellulaire à $6 \cdot 10^6$ cellules (pour $2 \cdot 10^6$ cellules/mL de fibrine à la fin). Le culot cellulaire est resuspendu dans 1,65 mL de milieu DMEM-F12 sans sérum.

On ajoute 1 ml de solution de thrombine à 2 U/ml et 150 µL de la solution de sels à la suspension cellulaire. Dans un Eppendorf de 5 mL, on mélange 600 µL de fibrinogène (50 mg/mL) à la totalité de la suspension cellulaire puis 600µL thrombine 2 U/mL.

On prélève 2 seringues remplies de 1,5 mL de la préparation par seringue. Chaque scaffold (un scaffold P60 et un scaffold MED-4850) est placé dans un récipient adapté de taille légèrement supérieure, puis recouvert par la préparation pour former une dragée contenant le scaffold. On laisse la fibrine polymériser au minimum pendant 30 mn à 37°C, puis les construits sont démoulés.

On prépare 40 mL de milieu de culture supplémenté DMEM-F12 avec 400 µL Insuline-Transferrine-Sélénium ITS (1%), 200 µL Ascorbate (50 µg/ml), 80 µL BMP-2 (200 ng/ml), 57µL insuline (5 µg/ml) et 2 mL d'hormone thyroïdienne (100 nM), qui est réparti dans 2 Erlenmeyers pour culture cellulaire. Chaque construit est introduit dans un Erlenmeyer et mis en agitation (environ 50 rpm) pendant 3 semaines. Le milieu de culture est renouvelé tous les 4 jours.

Protocole pour préparer 3 mL de gel de fibrine contenant des chondrocytes pour recouvrir le scaffold entier dans le moule

Un échantillon de cartilage unique est utilisé pour fabriquer un gel de chondrocytes permettant d'enrober un scaffold de taille réelle.

Le protocole est le même que pour enrober les scaffolds centimétriques, cependant les 2 seringues de 1,5 ml remplies de solution cellulaire et de fibrine sont adaptées sur le montage du scaffold de taille réelle dans son moule, puis injectées simultanément.

5. Protocole d'analyse de la viabilité cellulaire par test LIVE/DEAD.

On prépare une solution en additionnant 10 µl d'une solution d'iodure de propidium et 5 µl de solution de Calcéine-AM, provenant toutes deux du « Cellstain double staining kit » (04511 Sigma-Aldrich), à 5 ml de PBS. Deux fragments de construit cartilagineux sont prélevés, puis lavés au PBS. On ajoute du DMSO sur l'un des fragments pour servir de contrôle négatif dans lequel toutes les cellules seront mortes.

100 µL de la solution d'essai sont déposés sur chaque fragment, puis une incubation est réalisée à 37°C pendant 15 mn.

La fluorescence est observée au microscope après incubation. Les cellules vivantes et mortes sont visualisées simultanément. (La détection des cellules vivantes est faite grâce à la Calcéine-AM (excitation à 490 nm) et la détection de cellules mortes avec l'iodure de propidium (excitation à 545 nm)).

6. Protocole d'analyse de l'expression des gènes par Reverse Polymerase Chain Reaction PCR.

Ces analyses sont réalisées sur des fragments de construits cartilagineux prélevés sur les prototypes centimétriques après 3 semaines de culture.

6.1. Protocole d'extraction des ARN.

L'extraction des ARN est effectuée à l'aide d'un kit NucleoSpin RNA II (Macherey Nagel).

Les fragments de construit centimétrique sont placés dans un puit. 350 µL de tampon de lyse RA1 supplémenté de 10 µl/ml de β-mercaptoethanol est ajouté dans chaque puit pour lyser les cellules. Le lysat est filtré sur filtre Nucléospin puis centrifugé pendant 1 mn à 13 000 rpm.

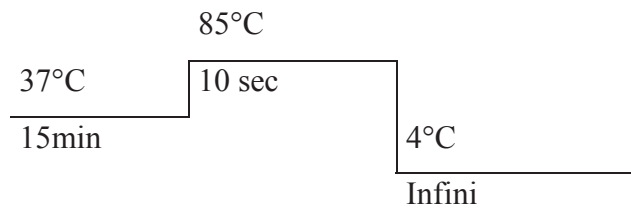
On ajoute 350 µL d'éthanol 70 % pour optimiser les conditions de liaison de l'ARN. Après fixation de l'ARN sur la membrane selon le protocole du fabricant, la membrane est dessalée par l'ajout de 350 µL de MDB (Membrane Desalting Buffer). Un traitement à la DNase est effectué pendant 15 mn à température ambiante pour éviter toute contamination par de l'ADN.

La membrane est ensuite lavée successivement avec 200 µL de solution RA2, puis 600 µL et 250 µL de solution RA3, qui vont respectivement inactiver la DNase et permettre l'élimination des sels et métabolites présents sur la membrane. Les ARN totaux purs sont finalement élués dans 60 µL d'eau RNase-free.

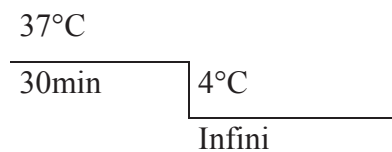
6.2. Protocole de transcription inversée.

La transcription inversée est effectuée à l'aide d'un kit Prime Script RT (TAKRR037A Takara). Les échantillons d'ARN purs sont préalablement dilués dans de l'eau sans RNase à une

concentration fixe d'ARN. 15 µl de chaque échantillon est ensuite dilué dans 15 µl de mélange constitué de 6 µl de buffer 5X, 6 µl de dT12VN (30 µM), 1.5 µl de transcriptase inverse et 1.5 µl d'Oligo dT (50 µM). La transcription inverse est ensuite effectuée sur un appareil Bio-Rad en suivant le cycle ci-dessous :



A la fin du cycle, l'ARN restant est éliminé en rajoutant 1 µl de RNaseH 2U/µL et en effectuant le cycle suivant :



6.3. Protocole de PCR quantitative (qPCR).

L'échantillon d'ADNc est dilué 1:2 avec de l'eau exempte de RNase et de DNase. Par échantillon, on prépare ensuite un mélange contenant 5,88 µL d'eau exempte de RNase et de DNase, 10 µL de SYBR GREEN et le mélange des primers sens et anti-sens nécessaires pour chaque gène d'intérêt (0.6 µL de chaque primer).

On distribue 16 µL du mélange dans les tubes à qPCR et on ajoute 4 µL d'échantillon d'ADNc à chaque tube.

Les contrôles de chaque gène sont remplis avec 16 µl du mélange et 4 µL d'eau.

La qPCR est réalisée sur instrument RotorGene Q Series (Qiagen), et les résultats sont exprimés en valeurs relatives normalisées par rapport au gène de référence RPL13A (protéine ribosomale), et quantifiés par la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Les primers spécifiques utilisés pour les analyses de qPCR sont présentés ci-dessous.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>COL1A1</i>	5'-CAGCCGCTTCACCTACAGC- 3'	5'- TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGC C-3'
<i>COL2A1</i>	5'- GGCAATAGCAGGTTACGTACA -3'	5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACT- 3'
<i>COL9A1</i>	5'-ACGGTTTGCCTGGAGCTAT-3'	5'-ACCGTCTCGGCCATTTCT-3'
<i>RPL13A</i>	5'-AAAAAGCGGATGGTGGTTC- 3'	5'-CTTCCGGTAGTGGATCTTG-3'

7. Protocole d'analyse des synthèses protéiques par Western Blot.

Ces analyses sont réalisées sur les construits centimétriques après 3 semaines de culture, puis après 6 semaines en souris nude.

Les fragments de prototypes centimétriques entourés de gel de cartilage sont rincés avec du PBS puis lysés et chauffés à 100°C avec du Laemmli.

Des quantités équivalentes de protéines sont séparées sur un gel.

Les protéines sont transférées sur membrane Immobilon (Millipore) puis incubées avec les anticorps primaires spécifiques de Sox9, des collagènes de type IX, II, I et de l'Actine pendant toute une nuit à 4°C après saturation. Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le tableau.

Anticorps primaires	Références
Sox9	AB5535 Millipore 1/3000
Collagène type IX	MAB3304 Millipore, 1/3000
Collagène type II	20211 Novotec 1/2500
Collagène type I	20111 Novotec 1/3000
Actine	A2066 Sigma 1/2000

Enfin, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires pendant une heure à température ambiante (anti-mouse or anti-rabbit, Cell signalling Danvers, MA, USA).

La détection des protéines est effectuée sur film photosensible (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) avec utilisation du kit Immun-star AP (Bio-Rad Hercules, CA, USA).

8. Protocole d'analyse par immunomarquage du collagène de type II.

Ces analyses sont réalisées sur les construits centimétriques après 3 semaines de culture, puis après 6 semaines en souris nude, et sur les construits de taille réelle après 3 semaines de culture.

On prélève des fragments de construits, qui sont fixés par une solution de paraformaldéhyde à 4% en PBS pendant 30min à 4°C.

Ensuite, les cellules sont perméabilisées par une solution de solution de triton X100 à 0,1% en PBS pendant 20min à température ambiante, puis bloquées par une solution de BSA -Sigma à 1% en PBS pendant 15min à température ambiante.

Un premier marquage est réalisé sur chaque fragment par l'ajout de 500 µL d'anticorps primaire anti-collagène de type II (mouse 6B3) dilué 1:200 en solution de blocage pendant 1h à température ambiante. Ensuite, un second marquage est effectué avec l'ajout de 500 µL d'anticorps secondaire (goat anti-mouse Alexa Fluor 546) dilué 1:500 en solution de blocage, par fragment, pendant 1h à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les noyaux sont marqués par une solution de Hoechst 333642 -Fluka 0,5 µg/mL, pendant 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Enfin, l'examen est réalisé au microscope confocal Spinning Disk inversé (Leica, Yokogawa), au microscope confocal inversé AxioObserverZ1 LSM800 ou au microscope fluorescent Eclipse Ti-E (Nikon).

9. Matériel utilisé pour les étapes liées à l'impression 3D.

Toutes les étapes de l'étude liées à l'impression 3D ont été réalisées dans les locaux de 3d-FAB sur le campus universitaire de la Doua, Université Lyon 1.

Le logiciel pour la conception des scaffolds et du moule est 3D Builder de Microsoft.

Les matériaux utilisés pour les prototypes centimétriques sont le polyuréthane Porolay P60 et le Silicone Nusil MED-4850.

Le matériau utilisé pour l'impression des scaffolds à taille réelle est le Silicone LSR4370 de ELKEM Silicones.

Le Porolay est un matériau polyuréthane composé de 2 polymères, l'un de type caoutchouc élastomère, et l'autre en PVA (acétate de polyvinyle) qui est hydrosoluble. L'impression se fait à 220°C. Après immersion, le composant soluble est dissous, et la structure interne devient microporeuse.

Les silicones sont des polymères issus de la Silice. L'impression se fait à basse température, puis une étape de réticulation est nécessaire pour fixer la forme de l'objet imprimé.

La machine d'impression 3D est l'imprimante 3D Liquid Deposition Modeling TOBECA-3d FAB.

Les paramètres d'impression définitifs des scaffolds centimétriques puis à taille réelle sont :

- Filament de 200 µm de diamètre.
- Hauteur de couche de 200 µm.
- Remplissage de la grille à 40%.

Le matériau utilisé pour l'impression du moule est le VeroClear de CADVision, imprimé par une machine de jet d'encre OBJET PRO.

Le traitement de surface du moule a été réalisé par karcher à jet d'eau pour le rendre mat.

La machine utilisée pour réaliser les tests mécaniques DMA est la DHR2 de Texas Instrument.

- Résultats et discussion :

Le but de cette première partie expérimentale a été de sélectionner un matériau qui permettra l'élaboration d'une prothèse de cartilage de cloison nasale, en fonction de son imprimabilité, de ses caractéristiques mécaniques, et de sa biocompatibilité.

Nous avons décidé de tester deux matériaux-candidats, en travaillant sur des prototypes de taille réduite, mais présentant une porosité qui pourra être reproduite au niveau du scaffold de la prothèse de cartilage de taille réelle.

La biocompatibilité de chaque matériau a été testée après enrobage d'un gel de cartilage et culture pendant 3 semaines, puis la stabilité du construit est testée par implantation sous la peau de la souris nude.

Une première étape a donc porté sur l'imprimabilité de ces matériaux en impression 3D, pour atteindre une porosité utile, puis sur leur biocompatibilité après enrobage d'un gel de chondrocytes humains, et enfin sur leur stabilité in vivo chez la souris.

R.1. : Résultats et discussion.

R.1.1 : Développement d'un scaffold centimétrique et imprimabilité des deux matériaux-candidats :

Cette étape est réalisée pour tester l'imprimabilité des deux matériaux-candidats au sein de 3d.FAB, et pour déterminer les paramètres d'impression permettant d'obtenir la porosité.

Le cahier des charges concernant le matériau de la prothèse a été défini au moment de l'élaboration du concept de la recherche.

R.1.1.1. Les matériaux candidats :

Le matériau du scaffold doit être non-résorbable, de grade médical et biocompatible. Il doit aussi être imprimable en technique 3D avec une structure en mailles pour créer une porosité au sein du scaffold, et capable de mimer les propriétés mécaniques du septum cartilagineux natif.

L'expertise de l'équipe 3dFAB a été cruciale pour retenir les deux matériaux candidats, qui sont le POROLAY Layfomm 60 (Polyuréthane) P60, et le silicone Nusil MED-4850 (Polydiméthylsiloxane) MED-4850.

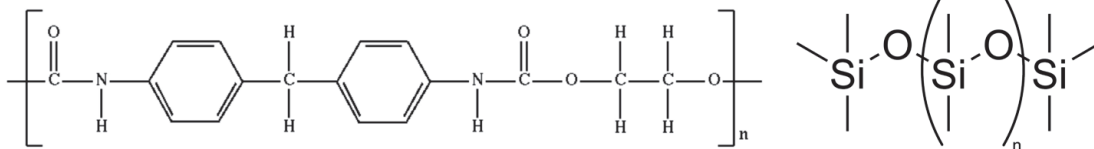
Ces deux matériaux sont disponibles sous forme de filaments pour l'impression 3D par la méthode de Filament Deposition Modeling qui correspond à une technique d'extrusion.

Le Porolay était au début de l'étude un nouveau matériau prometteur, sur le chemin d'un agrément pour le grade médical. Il a été décidé de le tester pour gagner en expertise sur ce matériau.

Le silicone Nusil MED-4850 était déjà agréé grade médical.

Porolay
(Polyuréthane)

Silicone
(Polydiméthylsiloxane)



R.1.1.2. Élaboration du scaffold centimétrique :

Les dimensions du scaffold déterminent la taille du construit cartilagineux. Les dimensions limitées du prototype ont été choisies pour permettre l'implantation chez la souris au cours de l'étude, dans des conditions acceptables par le Comité d'Éthique, tout en étant suffisantes pour étudier la structure en mailles offrant une porosité au scaffold.

Un modèle carré de 10 mm de côté et de 2 mm d'épaisseur a été choisi.

La conception assistée par ordinateur du modèle a été faite sur le logiciel 3D Builder, pour obtenir des modèles théoriques. Les paramètres d'impression ont été définis pour un filament de 200 µm de diamètre (diamètre de la buse d'extrusion), avec une hauteur de couche de 200 µm et une intercouche de 100 µm dans les pores. Une porosité transfixiante a été choisie pour

permettre l'ancrage du gel de chondrocytes, et deux formes de porosité ont été testées (en sablier et en hémisablier).

La porosité théorique a été définie par modélisation informatique, en déterminant les dimensions internes d'un pore en hémisablier :

- 1000 μm de diamètre maximal.
- 200 μm de diamètre minimal.

Les modèles imprimés dans chaque matériau ont été comparés au modèle théorique attendu pour évaluer la qualité de l'imprimabilité (respect des paramètres théoriques définis dans les modèles imprimés).

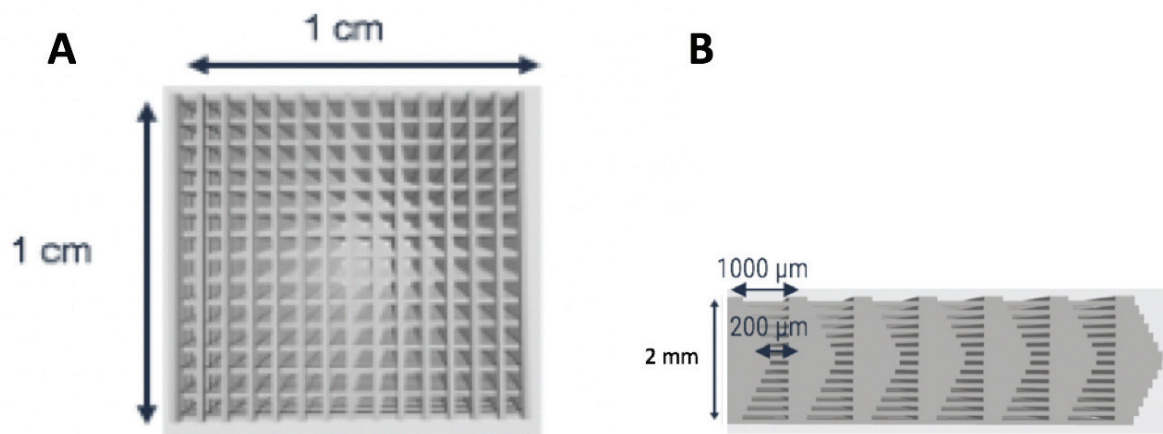


Figure 21 : Modèle théorique généré par le logiciel en vue supérieure (A) et en vue latérale avec la porosité en hémisablier (B).

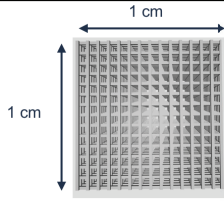
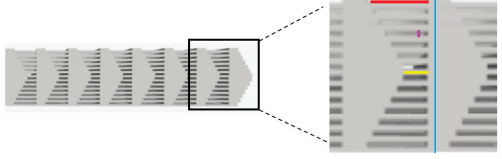
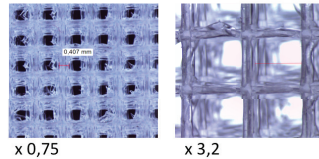
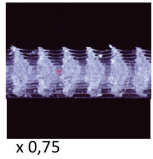
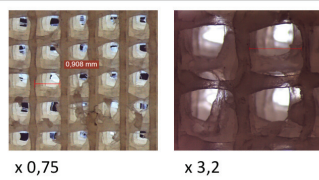
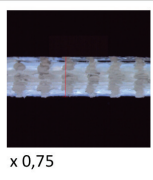
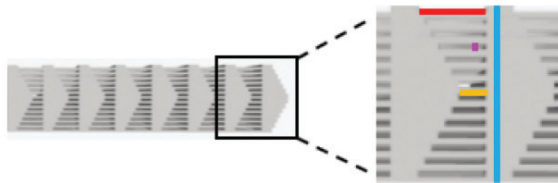
		A - Top view	B - Side view
Computational model			
Printed model	MED-4850		
	Porolay 60		

Figure 22 : Résultat de l'impression : Observation des porosités obtenues en vue de surface et en vue de profil et comparaison des modèles théoriques en microscopie optique.



	Theoretical values	Measured values	
		MED-4850	P60
Minimal porosity	200 µm	203 µm	258 µm
Maximal porosity	1000 µm	922 µm	841 µm
Thickness	2 mm	2,05 mm	1,817 mm
Interlayer thickness	100 µm	95 µm	N/A

Figure 23 : Tableau de comparaison des paramètres d'impression et des mesures de porosité pour le MED-4850 et le P60, en fonction des paramètres des pores en hémisablier.

Conclusion :

En microscopie, les pores du P60 sont moins bien ouverts que les pores du MED-4850. Le gradient de la forme en sablier est mieux respectée avec le silicone. La surface est plus irrégulière avec le P60.

Les valeurs mesurées sont plus éloignées du modèle théorique avec le P60. Le diamètre maximal du pore est plus faible avec le P60, alors que le diamètre minimal est plus grand, traduisant un différentiel plus faible et une perte relative de la forme en sablier. L'épaisseur du P60 est inférieure à l'attendue, traduisant une tendance à la rétraction du matériau, ou un effondrement partiel des couches imprimées. L'épaisseur intercouche n'a pas pu être mesurée avec le P60, par défaut d'individualisation de chaque couche.

Ainsi, l'imprimabilité du silicone MED-4850 est meilleure que celle du P60.

R.1.2 : Étude de biocompatibilité avec chaque biomatériau :

Le concept NASALTIS nécessite l'enrobage du scaffold imprimé dans un matériau, par un gel de chondrocytes humains. Les chondrocytes sont obtenus après extraction et amplification de chondrocytes issus d'un don de résidus opératoires.

L'objectif est de vérifier que les chondrocytes humains se comportent de façon habituelle quand ils sont placés dans un gel de fibrine au contact de ces matériaux présentant une porosité.

Le laboratoire a par le passé montré son expertise avec l'utilisation de chondrocytes articulaires et nasaux, amplifiés puis cultivés dans des supports solides ou liquides. Les facteurs permettant l'amplification puis la culture des chondrocytes ont été très bien caractérisés (38).

Le laboratoire a longtemps travaillé sur BMP-2, puis les travaux d'Hoshi ont permis de caractérisés la combinaison la plus favorable pour l'amplification puis la culture des chondrocytes. Le laboratoire a déjà montré l'efficacité du cocktail chondrogénique FI-BIT (FGF-2 + Insuline puis BMP-2 + Insuline + Triiodothyronine) sur des chondrocytes humains articulaires en présence d'éponges de collagène (39)(40), d'hydrogel de fibrine (37) et de IEIK13 (21). L'efficacité de FI-BIT a aussi été montrée sur des chondrocytes nasaux dans le gel d'agarose (6) et l'hydrogel IEIK13(7).

Le protocole d'utilisation de FI-BIT est donc a priori robuste, car il fonctionne sur des chondrocytes humains en présence de supports aussi variés que des éponges de collagène, des hydrogels à base d'agarose, de fibrine ou de IEIK13. Au cours de ce projet, il a fallu néanmoins

confirmer que les chondrocytes nasaux, comme les chondrocytes articulaires, répondent de façon très favorable au cocktail chondrogénique BIT, lorsqu'ils sont inclus en gel de fibrine et en présence d'un matériau imprimable candidat.

R.1.2.1. : Obtention d'un gel de chondrocytes.

- Don de résidus opératoires.

Le don de résidus opératoires a permis de récupérer des fragments de cartilage septal, auprès de patients opérés de chirurgie de la cloison nasale à l'hôpital Édouard Herriot. Ces patients, opérés sous la responsabilité du Dr VERTU-CIOLINO, ont donné leur accord avant la chirurgie pour l'utilisation de leurs résidus opératoires à des fins de recherche. Ce protocole a été déclaré dans la base AGORA des Hospices Civils de Lyon.

- Extraction des chondrocytes.

Le volume du don de chondrocytes est de l'ordre de quelques mm³. Les chondrocytes sont extraits par double digestion enzymatique selon un protocole validé dans le service.

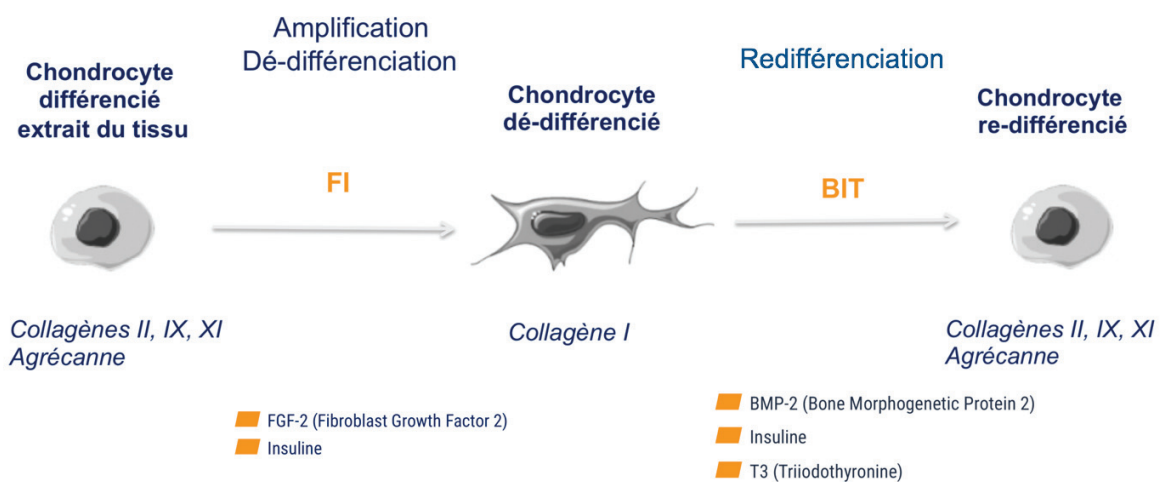


Figure 24 : Évolution du phénotype des chondrocytes après amplification avec FI puis culture avec BIT.

- Amplification des chondrocytes.

Les chondrocytes sont amplifiés avec un mélange associant FGF-2 à 5 ng/mL et Insuline à 5 microg/mL, pendant 1 à 2 semaines, avec surveillance en microscopie pour s'adapter à la cinétique d'amplification, selon le protocole validé dans le service.

L'observation au microscope permet de voir que les chondrocytes perdent leur phénotype sphérique typique au fur et à mesure de l'amplification. Ils prennent un aspect fusiforme avec pseudopodes confirmant un phénotype fibroblastique dédifférencié. Cette évolution est liée au caractère bidimensionnel à la surface de la boîte de culture, et à l'action du mélange FGF-2 et Insuline.

- Coulage des chondrocytes en hydrogel de fibrine puis ensemencement des scaffolds centimétriques.

À la fin de l'amplification, les chondrocytes (dédifférenciés) sont coulés en gel de fibrine, pour obtenir un gel de chondrocytes.

Ce gel de chondrocytes est rapidement déposé autour du scaffold puis l'ensemble des construits sont cultivés pendant 3 semaines.

Le scaffold centimétrique est positionné dans un récipient de taille légèrement supérieur à ses dimensions pour être recouvert de gel, puis démoulé après coagulation de la fibrine.

L'hydrogel de fibrine a été retenu en raison de l'existence du produit agréé pour l'utilisation en chirurgie. Un produit appelé TISSEEL est agréé Dispositif Médical en qualité de colle biologique, avec des applications dans l'hémostase des tissus, dans l'étanchéité des anastomoses digestives. Il pourra être utilisé au moment de l'application en recherche clinique.

L'hydrogel de fibrine se comporte comme un substrat pour les chondrocytes, et permet la diffusion des facteurs du milieu de culture. Il fournit également un environnement tridimensionnel aux chondrocytes. Des travaux de l'équipe ont montré que cet aspect favorisait la redifférenciation des chondrocytes issus de la phase d'amplification, par une action synergique des facteurs solubles ajoutés au milieu de culture, et de l'environnement tridimensionnel(7).

Cet hydrogel de fibrine est résorbable, permettant sa substitution par la matrice extracellulaire progressivement sécrétée par les chondrocytes.

R.1.2.2. : Étude de la biocompatibilité après culture *in vitro* des construits.

- Culture *in vitro* et évolution du phénotype cellulaire.

Les construits centimétriques sont cultivés pendant 3 semaines dans un milieu enrichi en facteurs solubles aux propriétés chondrogéniques (cocktail chondrogénique) : BMP-2 à 200 ng/mL, Insuline à 5 µg/mL, et T3 (triiodothyronine) à 100 nmol/L, selon un protocole validé par l'équipe. Ce cocktail chondrogénique est appelé BIT.

La double action synergique de l'environnement tridimensionnel et du cocktail chondrogénique a montré que les chondrocytes retrouvaient un phénotype sphérique, et que les expressions géniques et les synthèses protéiques étaient conformes à celles d'un tissu cartilagineux.

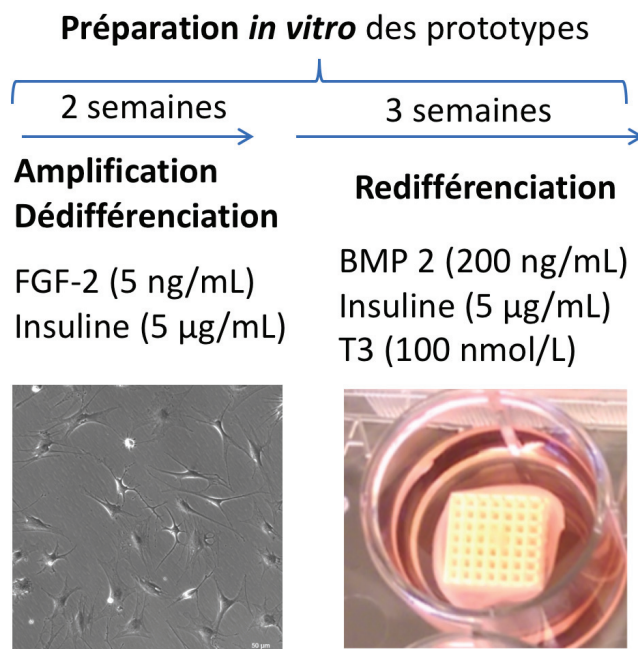


Figure 25 : Résumé du protocole de fabrication des construits centimétriques.

L'environnement tridimensionnel procuré par l'hydrogel de fibrine est favorable à une organisation du cytosquelette qui aboutit à une expression du phénotype chondrogénique.

En effet, quand on amplifie les chondrocytes en 2D (monocouche), le cytosquelette est polymérisé en fibres de stress, déclenchant une signalisation conduisant à la production de protéines fibreuses comme le collagène I.

Quand on inclut les chondrocytes dans un hydrogel, le cytosquelette d'actine est dépolymérisé devenant globulaire et rendant les chondrocytes sphériques, déclenchant une signalisation

conduisant à l'expression de gènes chondrogéniques et à la production de protéines caractéristiques du cartilage, comme le collagène II.

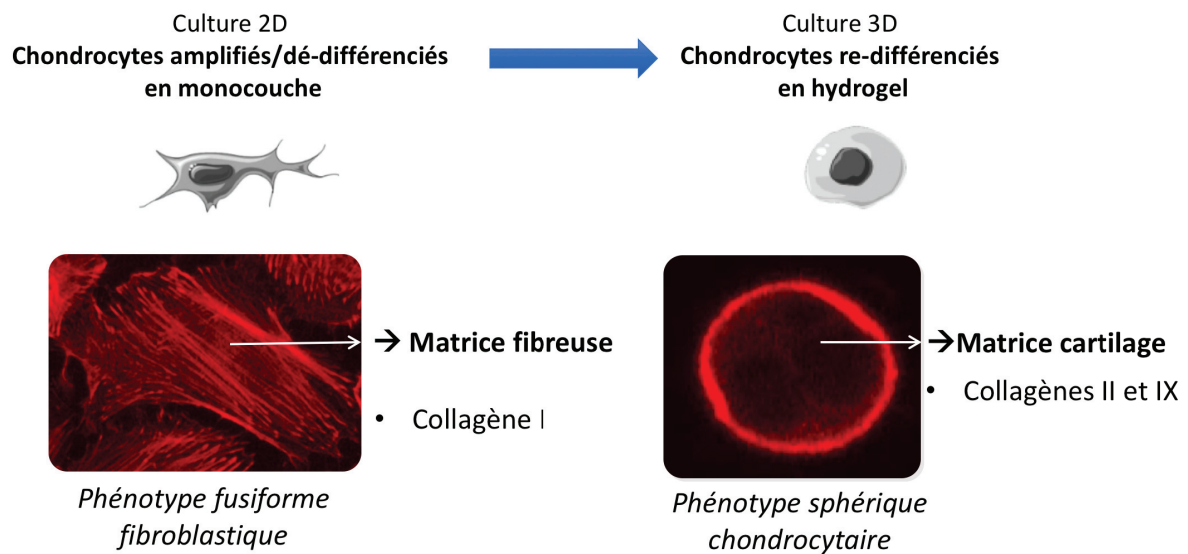


Figure 26 : Redifférenciation chondrocytaire médiée par les facteurs solubles chondrogéniques en synergie avec le caractère tridimensionnel du support pendant la culture.

Les analyses sont effectuées après 3 semaines de culture du gel de chondrocytes au contact de chaque scaffold centimétrique, avec le cocktail chondrogénique BIT. Une paire de construit est cultivée dans un milieu de culture non supplémenté en cocktail BIT pour servir de groupe contrôle.

Ces analyses ont pour but :

- de confirmer l'efficacité du cocktail BIT dans la redifférenciation chondrocytaire.
- de vérifier la qualité du phénotype chondrocytaire par PCR, par Western Blot, et par immunofluorescence.

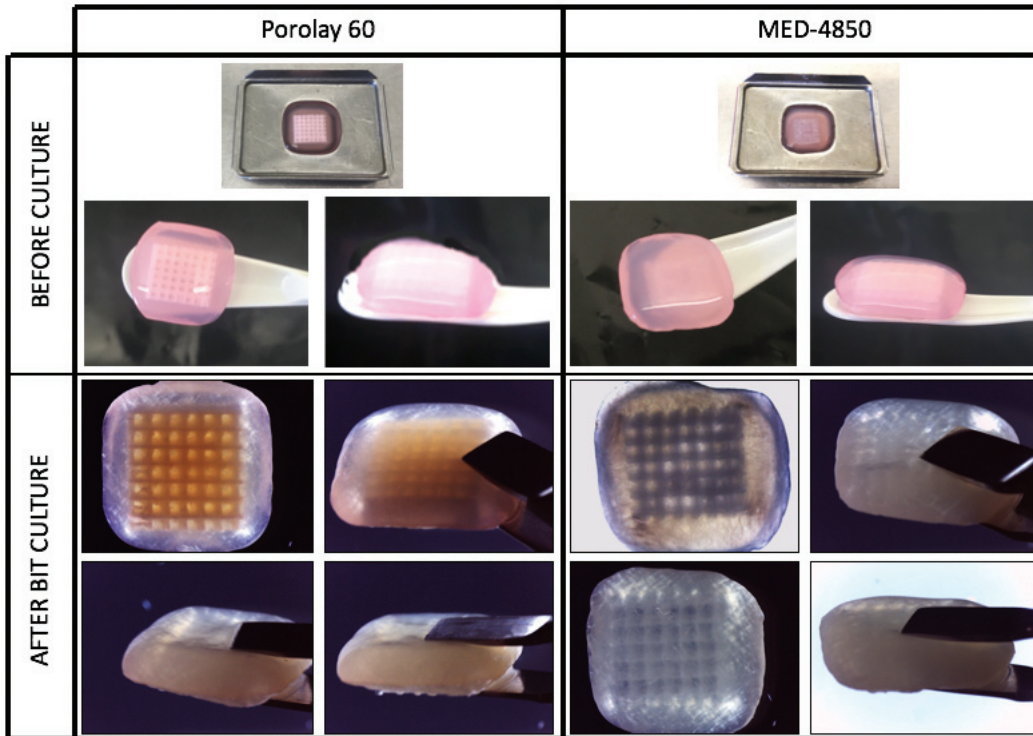


Figure 27 : Aspect comparatif des scaffolds centimétriques de P60 et de MED-4850 recouverts de l'hydrogel de fibrine chargé de chondrocytes au moment du coulage (avant la culture), puis après 3 semaines de culture en milieu BIT.

Le tissu cartilagineux natif est caractérisé par l'abondance du collagène de type II et de type IX dans sa matrice extracellulaire. Le collagène de type I est un marqueur tissulaire non différencié. La présence de collagène de type I indique un tissu dédifférencié, alors que la présence de collagène de type II et IX indique une différenciation cellulaire de type chondrocytaire. La qualité du phénotype chondrocytaire est vérifiée par l'augmentation de la quantité de Collagène de type II et IX grâce au cocktail BIT, et par la diminution de la quantité de Collagène de type I sur cette même période, par rapport aux construits "contrôle" qui n'ont pas été exposés au cocktail BIT pendant les 3 semaines de culture.

La présence de Collagènes de type I, de type II et de type IX est mesurée par PCR et Western Blot à la fin de l'amplification puis à la fin de la culture. La présence de Sox9 et d'Actine est également recherchée par Western Blot. Enfin, une analyse par immunofluorescence sur le Collagène de Type II est menée en fin de culture.

L'analyse macroscopique à la fin de la culture ne met pas en évidence de différence notable entre les construits en P60 et en MED-4850.

- Analyses des expressions géniques par PCR sur les construits en P60 et en MED-4850.

Les expressions géniques recherchées sont *COL1A1*, *COL2A1* et *COL9A1*.

Les analyses PCR sont réalisées selon le protocole.

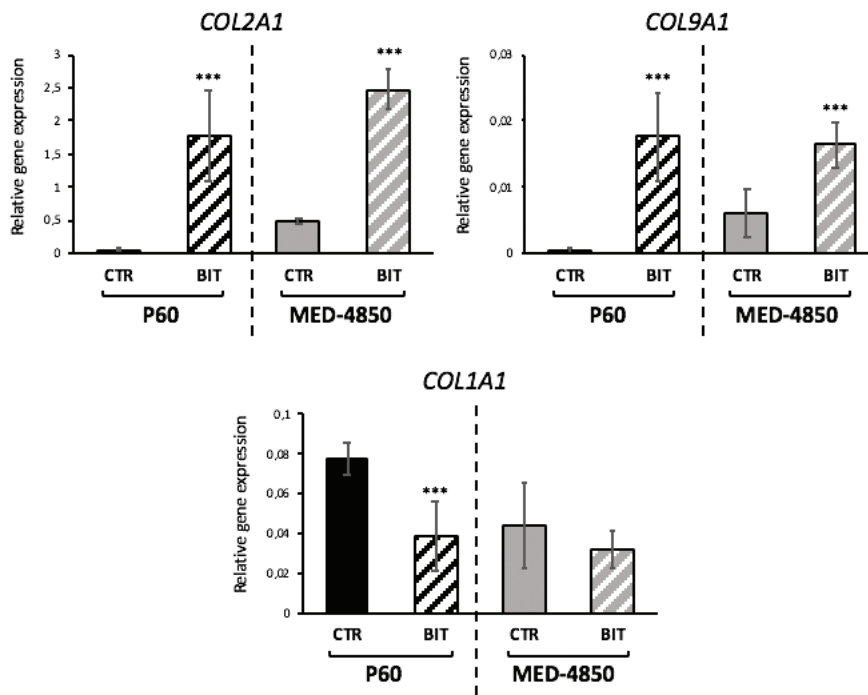


Figure 28 : PCR comparatives entre les contrôles cultivés 3 semaines sans BIT, et les construits cultivés 3 semaines avec BIT.

L'expression des gènes *COL2A1* et *COL9A1* augmente de façon significative pour le P60 et le MED-4850. Le gène *COL1A1* diminue significativement sur la même période avec le P60, et diminue aussi avec le MED-4850 mais de façon non significative.

Dans les contrôles, l'expression génique de *COL2A1* et de *COL9A1* montre une nette différence quantitative en faveur du MED-4850 entre le P60 et le MED-4850. De même, la quantité de *COL1A1* est inférieure avec le MED-4850.

Conclusions des analyses par PCR : l'ensemble des paramètres mesurés semblent indiquer que la différenciation chondrocytaire se déroule correctement avec les 2 matériaux.

- Analyses des sécrétions protéiques par Western Blot.

Les protéines recherchées sont le collagène de type I, le collagène de type II, le collagène de type IX, la protéine Sox9, et l'actine.

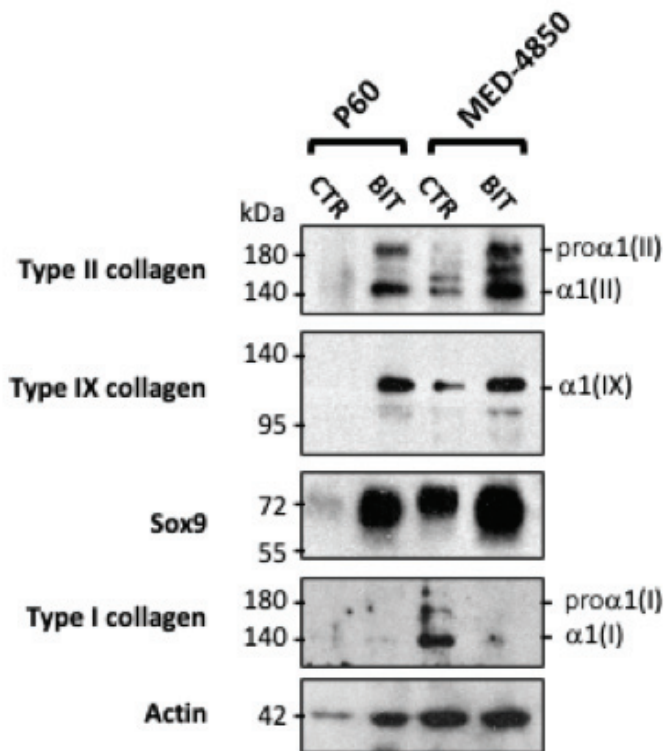


Figure 29 : Analyses Western Blot comparatives entre les contrôles cultivés pendant 3 semaines sans BIT, et les construits cultivés pendant 3 semaines avec BIT. On distingue la présence de pro-collagène II (collagène immature) et la présence de collagène II mature.

L'échantillon contrôle de P60 montre une quantité d'Actine faible, et une expression très faible des 3 types de collagènes et de Sox9. L'extraction protéique de l'échantillon contrôle CTR/P60 n'a pas été optimale comme le montre le faible niveau d'actine détectée. Comme l'analyse PCR de ce contrôle avait montré une expression de collagène de type I facilement détectable, il ne s'agit vraisemblablement pas d'un effet toxique du matériau P60 envers les cellules.

Le collagène de type II est fortement exprimé dans les construits P60 et MED-4850, avec expression de peptides $\alpha 1$ et de peptides $\text{pro}\alpha 1$. La présence de procollagène de type II $\text{pro}\alpha 1$ (II), qui est la forme immature du collagène, atteste que les cellules sont métaboliquement actives au moment de l'analyse.

Le collagène de type II est faiblement exprimé dans les échantillons n'ayant pas bénéficié de BIT, et la présence de peptides $\text{pro}\alpha 1$ est quasi nulle. La production continue de collagène de type II ne peut pas être affirmée dans les échantillons contrôles.

Le collagène de type IX est fortement exprimé dans les construits P60 et MED-4850, avec présence de peptides $\alpha 1$, mais sans expression de peptides $\text{pro}\alpha 1$. Il est plus faiblement exprimé dans l'échantillon contrôle MED-4850, et son expression est nulle dans le contrôle P60.

La protéine Sox9 est un facteur de transcription des protéines chondrogéniques. Elle est beaucoup plus exprimée dans les échantillons ayant reçu BIT. Sa détection et sa stimulation par BIT par rapport au contrôle atteste que les cellules sont métaboliquement actives et orientées vers une activité chondrogénique.

Le collagène de type 1 montre une expression exclusivement dans l'échantillon contrôle MED-4850. Il est absent dans l'échantillon contrôle P60, ainsi que dans les échantillons soumis à BIT. On a l'impression d'une inhibition du collagène de type I.

Ainsi, le cocktail BIT favorise la production de collagène de type II et de type IX, et de la protéine Sox9, car la production est plus faible dans les échantillons-contrôle cultivés sans BIT. La production de collagène de type I est inhibé en conditions de culture BIT.

En conclusion, le gel de chondrocytes exprime des protéines spécifiques des chondrocytes à la fin de la culture avec BIT, ce qui signifie que les cellules ont été dirigées vers une redifférenciation chondrocytaire. La disparition de l'expression du Collagène de type I après utilisation de BIT indique que les cellules ne sont plus dans une voie de dédifférenciation de type fibroblastique.

La présence de bandes de migration correspondant au collagène II mature et au collagène IX est un signe ces molécules sont présentes et peuvent s'assembler au niveau des fibres dans la matrice extracellulaire. Ceci est confirmé par nos immunofluorescence qui montrent un marquage péricellulaire du collagène II.

La culture au contact des biomatériaux n'empêche pas la redifférenciation chondrocytaire.

- Analyses en immunofluorescence du collagène de type II.

Il s'agit d'une analyse morphologique qui doit permettre de vérifier le remplissage des pores par le gel de chondrocytes, et la répartition des cellules dans le gel. De plus, le marquage du collagène de type II permet de voir la présence de collagène de type II à l'intérieur et à l'extérieur des cellules.

Les construits analysés sont ceux qui ont bénéficiés de l'apport du cocktail BIT dans le milieu de culture pendant 3 semaines.

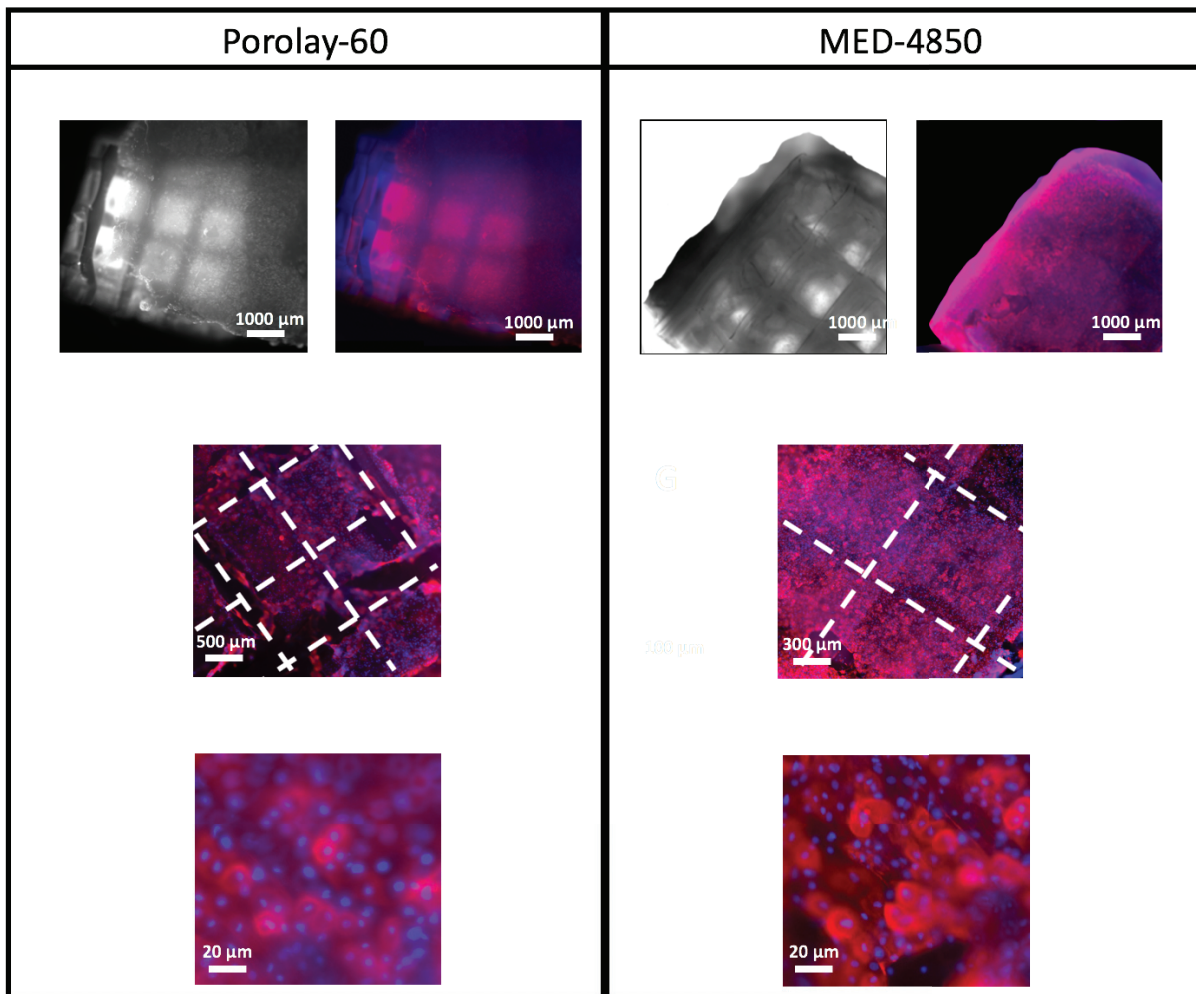


Figure 30 : Observation comparative entre les construits en P60 et en MED-4850 en immunofluorescence du collagène de type II en microscopie à la fin de la culture in vitro avec le cocktail BIT.

L'immunofluorescence est homogène dans le gel à la surface et dans les pores du MED-4850. L'examen au grossissement maximal montre la présence du marquage au collagène de type II au niveau intra- et extracellulaire, avec un phénotype cellulaire sphérique, compatible avec des cellules redifférenciées. La présence de collagène de type II indique une production protéique de type chondrocytaire pendant la période de culture in vitro avec le cocktail BIT. Le collagène de type II est la protéine majoritaire au sein du cartilage hyalin.

En conclusion des immunomarquages du collagène de type II, on peut dire que la production de collagène de type II est présente dans tous les construits. La présence de collagène de type II mature attestée par ailleurs de la présence de collagène II extracellulaire. Les cellules répondent favorablement au cocktail BIT dans les deux cas.

Conclusion des analyses à la fin de la culture in vitro pendant 3 semaines :

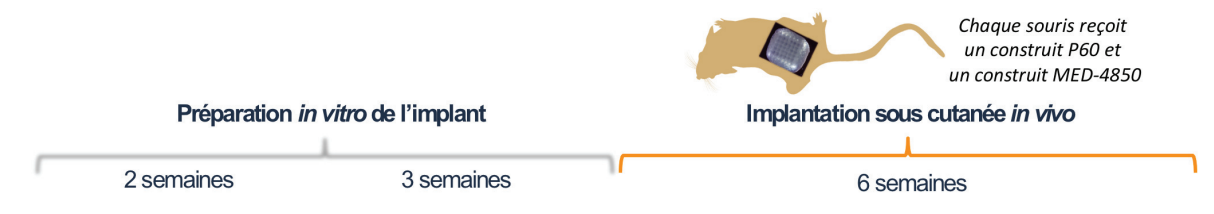
Il a été possible de confirmer le caractère métaboliquement actif des cellules, et d'affirmer la qualité du phénotype chondrocytaire avec redifférenciation par action du cocktail BIT et de l'environnement tridimensionnel.

L'immunofluorescence montre la synthèse d'une matrice extracellulaire riche en collagène de type II qui est la protéine principale et caractéristique du cartilage hyalin.

À ce stade, il est possible de parler de gel de cartilage en formation.

R.1.2.3. : Évolution de la stabilité des construits centimétriques après implantation chez la souris nude pendant 6 semaines.

Nous avons construit 4 paires de construits centimétriques, formés d'un construit à partir d'un scaffold en P60 et d'un autre construit à partir d'un scaffold en MED-4850. Chaque paire a été fabriquée avec le gel de chondrocytes d'un même donneur, partagé entre les 2 scaffolds de la paire. Chaque paire a été implantée dans la même souris nude.



Il ne s'agit pas de tester la biocompatibilité de l'implant. La souris est utilisée comme un bioréacteur, et cette étape est réalisée pour tester la stabilité du gel de cartilage au contact de chaque matériau *in vivo* sur une période prolongée dans un organisme vivant, et pour tester la résistance du gel de cartilage à la tension de la peau de la souris en conditions dynamiques.

Ces manipulations ont été approuvées par le Comité d'Éthique et réalisées dans l'animalerie du LBTI.

Nous avons implanté 4 souris nude, qui ont chacune reçu un construit P60 et un construit MED-4850. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale au bout de 6 semaines, et les construits ont été explantés.

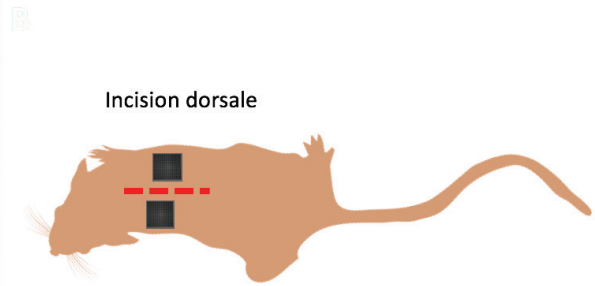


Figure 31 : Implantation en position dorsale chez la souris nude d'un construit P60 et un construit MED-4850.

Les analyses réalisées après explantation sont :

- analyse macroscopique des construits.
- analyses en immunofluorescence du collagène de type II.

- Analyse macroscopique après explantation :

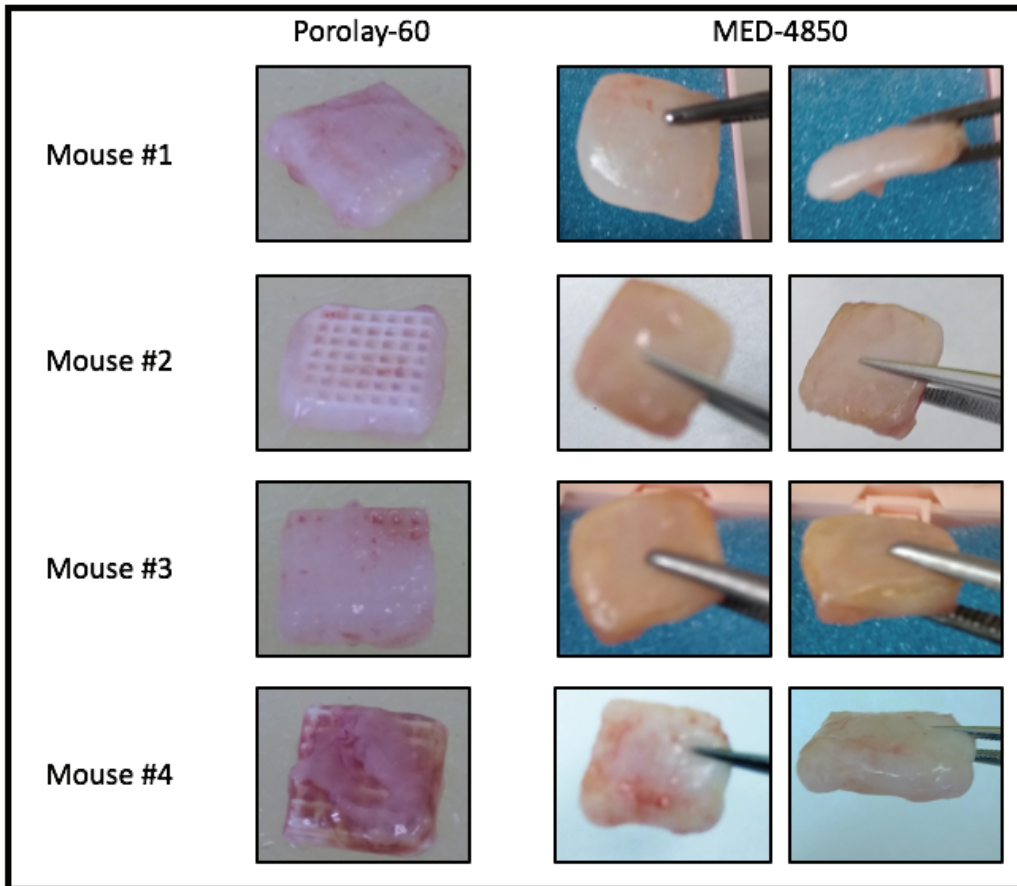


Figure 32 : Aspects macroscopiques des construits centimétriques après explantation de la souris.

Les construits P60 sont globalement en bien moins bon état que les construits MED-4850. Ils apparaissent décapés avec une réduction sévère de l'épaisseur du gel dont l'épaisseur s'est réduite de 50 à 100 % sur les deux faces. Il reste uniquement du gel sur les tranches du construit de la souris #3, comme si le frottement de la peau sur les zones tangentielles du construit avait détruit le gel. Il est également possible qu'une partie du gel soit restée dans les tissus de la souris au moment de l'explantation, par moindre adhésivité du gel sur le scaffold que dans les tissus. Les construits MED-4850 présentent un gel mieux identifiable autour du scaffold, et dont l'ancrage semble plus solide, car il n'a pas tendance à se détacher du scaffold. Les pores ne sont pas visibles à travers le gel de cartilage qui semble assez dense et homogène. Les limites du gel de cartilage par rapport aux tissus de la souris sont clairement identifiables. L'épaisseur du gel sur les faces s'est réduite d'environ 30%. Seule la souris #4 présente des expositions du scaffold aux niveaux des angles du construit, semblant indiquer des frottements plus importants au niveau des zones qui étaient moins adaptées à la courbure du thorax de l'animal.

En conclusion de nos observations, il apparait donc que gel de cartilage a mieux persisté et apparait mieux ancré avec le MED-4850.

- Analyses par immunofluorescence du collagène de type II après explantation.

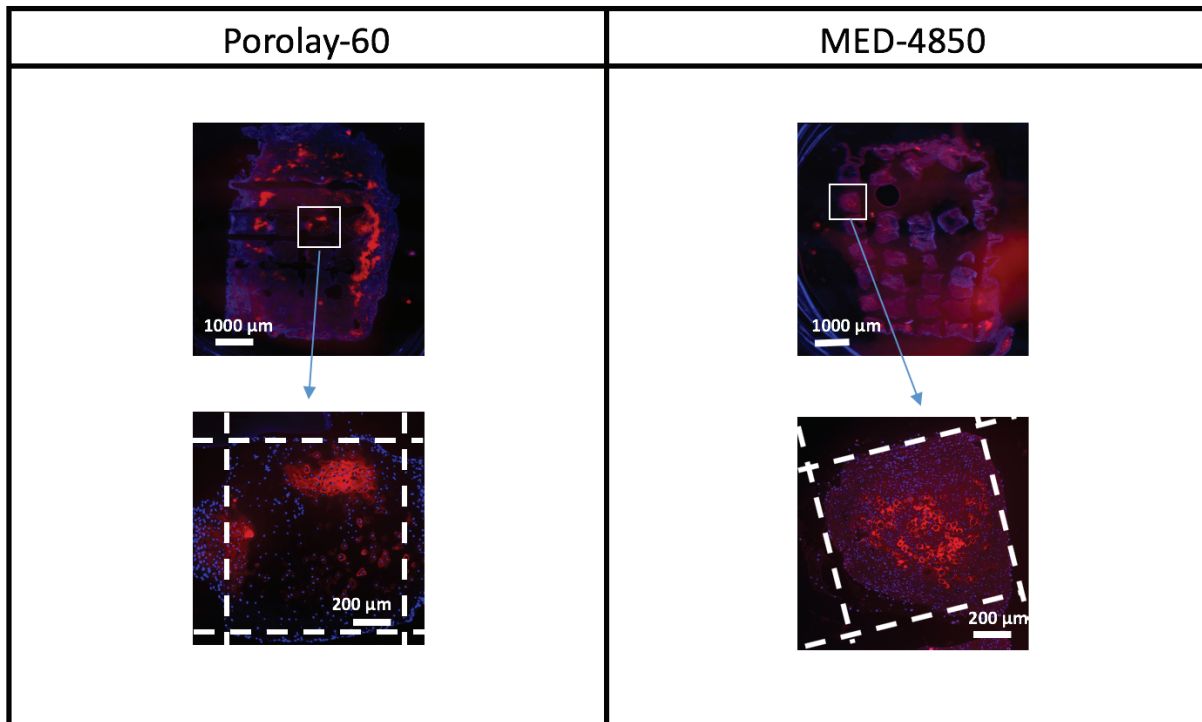


Figure 33 : Immunofluorescence du collagène de type II après explantation de la souris. On note un début de construction de matrice extracellulaire contenant du collagène de type II autour des cellules présentes dans le gel de fibrine associé au P60 et au MED-4850.

L'immunofluorescence est très faible dans les pores des scaffold en P60, qui semblent n'être plus que partiellement remplis par le gel.

L'immunofluorescence est plus importante et homogène dans tous les pores du MED-4850, signalant que les pores sont encore bien remplis de gel de cartilage.

Cet aspect est cohérent avec l'analyse macroscopique, qui montrait que le gel était très abimé et en quantité faible autour des scaffolds P60.

Ainsi, nous pouvons conclure que le matériau Porolay est moins favorable que le MED-4850.

Discussion.

Les essais concernant l'imprimabilité des deux matériaux mettent en évidence une qualité supérieure d'imprimabilité pour le silicone MED-4850. Le respect des dimensions du modèle théorique est meilleur, et la structuration en mailles est mieux respectée, ce qui est une priorité pour assurer l'ancrage du gel sur le scaffold.

À l'issue de la culture in vitro, les tests PCR et Western Blot ne montrent pas de différence significative entre les deux matériaux. La redifférenciation chondrocytaire a été induite par l'action du cocktail BIT comme cela était attendu, montrant que les matériaux étaient biocompatibles. Les résultats de l'immunofluorescence pour le collagène de type II ont montré la fabrication d'une matrice extracellulaire de type cartilagineuse dans les deux cas.

À l'issue de l'implantation dans les souris nude, les résultats sont nettement différents, en macroscopie et en immunofluorescence, en faveur du MED-4850. En effet, le gel autour du scaffold en P60 a mal évolué au cours des 6 semaines dans la souris, probablement en raison d'un moins bon ancrage du gel entraînant un défaut de résistance aux contraintes physiques exercées par la peau sur le long terme.

Nous avons décidé de ne pas poursuivre les efforts pour faire agréer le matériau Porolay, car il ne donne pas de bons résultats d'imprimabilité, et ne permet pas un ancrage dans la durée du gel de cartilage.

Il apparaît donc que le Silicone MED-4850 est le meilleur candidat, car son imprimabilité autorise une porosité satisfaisante responsable d'un bon ancrage. Il a montré de bons résultats in vitro et in vivo. Il est de plus déjà de grade médical.

Le matériau sélectionné pour sa biocompatibilité va désormais être utilisé pour développer une prothèse de cartilage septal de dimensions réelles.

Les dimensions et les qualités mécaniques de cette prothèse doivent être directement inspirées du septum cartilagineux natif. Le scaffold de la prothèse lui confère ses dimensions et son comportement mécanique.

La première étape va consister en l'étude des qualités mécaniques de plusieurs septums natifs prélevés sur des cadavres frais pour obtenir une référence des valeurs mécaniques à atteindre par le scaffold.

La deuxième étape a été de développer le scaffold de dimensions adéquates pour le maximum de patients. Son design est directement inspiré des techniques chirurgicales actuelles basées sur la mise en place d'une équerre septale capable de redonner sa projection et sa forme à la pyramide nasale (Technique du L de Killian). Un moule permettant le coulage du gel de fibrine autour de ce scaffold complexe a aussi été créé.

Ensuite, le construit de taille réelle a été cultivé in vitro pendant 3 semaines, puis la qualité du gel de cartilage a été analysée par immunofluorescence.

Enfin, un essai d'implantation a été réalisé chez le cadavre, car il n'existe pas de modèle animal pour le nez humain cartilagineux.

R.2. : Résultats et discussion.

R.2.1. - Études mécaniques sur septum cartilagineux de cadavres frais pour déterminer des références du module d'Young par flexion 3 points et compression.

Les valeurs mécaniques du cartilage septal ont déjà été bien étudiées (17).

Cependant, nous avons besoin de valeurs de référence avec une machine unique pour comparer des septums de cadavres frais avec les scaffolds de taille réelle. Ainsi, les propriétés mécaniques à atteindre par les construits de taille réelle sont validées dans le laboratoire 3d.FAB.

R.2.1.1. Prélèvement de 6 septums au laboratoire d'anatomie Rockefeller de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Après demande d'autorisation pour prélever des septums de cadavres dans un but de recherche, et engagement de respecter la dignité des donneurs, il a été permis de prélever 6 septums entiers sur des cadavres frais non formolés.

Les prélèvements ont été immédiatement transportés jusqu'aux locaux de 3d.FAB pour y réaliser les études mécaniques.

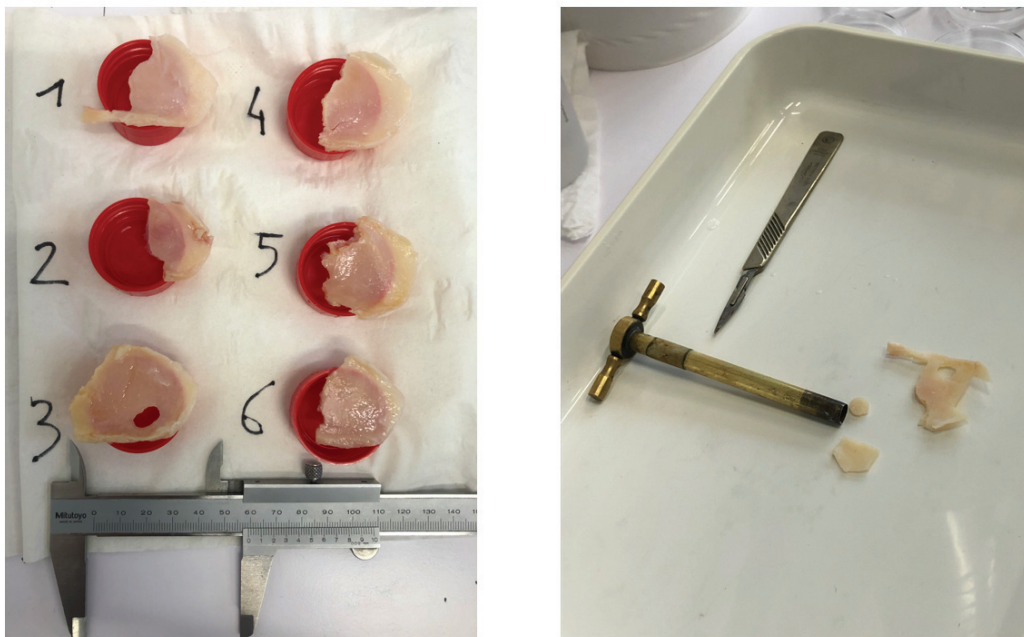
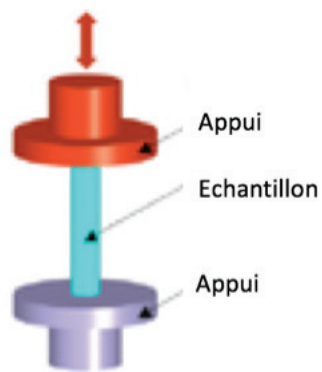


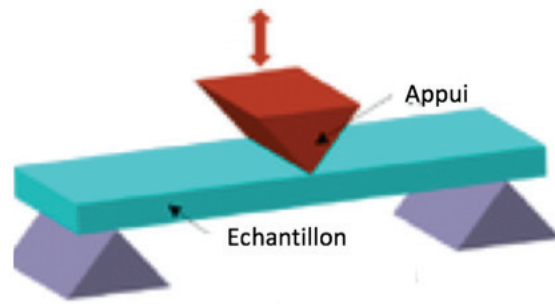
Figure 34 : 6 septums de cadavres prélevés au laboratoire d'Anatomie. Matériel de prélèvement par bistouri et emporte-pièce des deux fragments étudiés.

R.2.1.2. Étude DMA (Dynamic Mechanical Analysis) au laboratoire 3d.FAB sur le site de la Doua de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Les tests réalisés sur la machine DHR2 de Texas Instrument sont le test de flexion 3 points et le test de compression. Ils permettent d'extraire le module d'Young et le spectre visco-élastique du cartilage septal.



Test de compression



Test de flexion 3 points

Figure 35 : Principe des tests de compression et de flexion 3 points.

Deux échantillons sont prélevés sur chaque septum. Le premier fragment mesure 15 * 10 mm et est destiné au test de flexion 3 points. Le second, prélevé avec un emporte-pièce de 5 mm de diamètre, est destiné au test en compression.

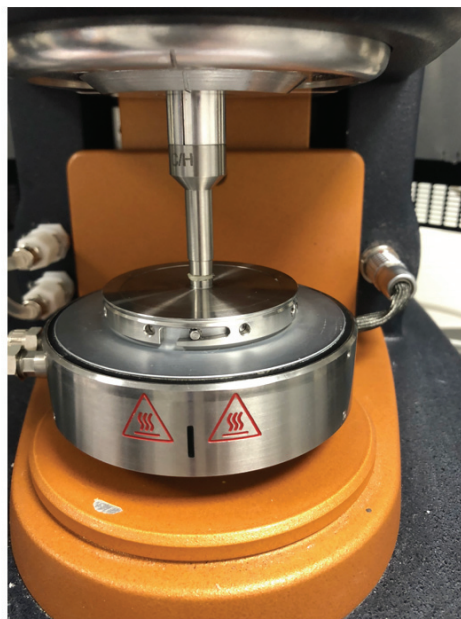
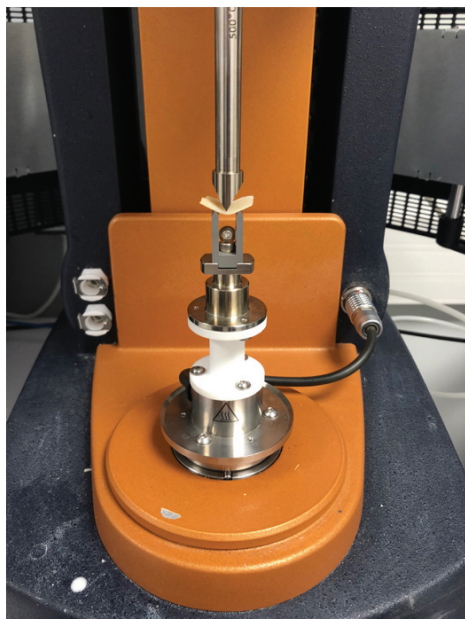


Figure 36 : Machine de DMA équipée du module de flexion 3 points (à gauche), et du module de compression (à droite). Les échantillons sont en place.

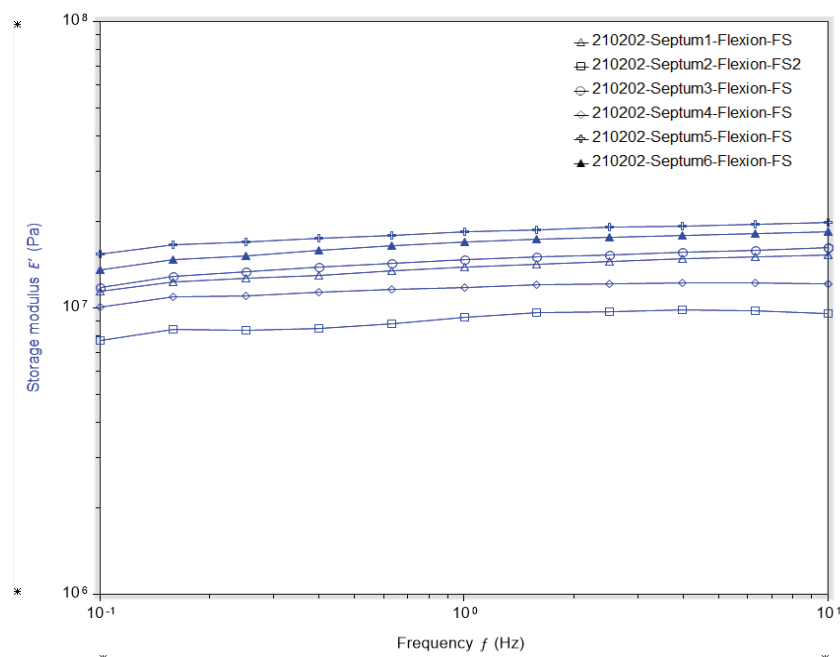


Figure 37 : Diagramme d'expression du module d'Young en fonction de la force appliquée en flexion 3 points.

Résultats : La valeur du module d'Young du cartilage septal est de l'ordre de 10^7 Pa. Tous les septums testés sont du même ordre de grandeur.

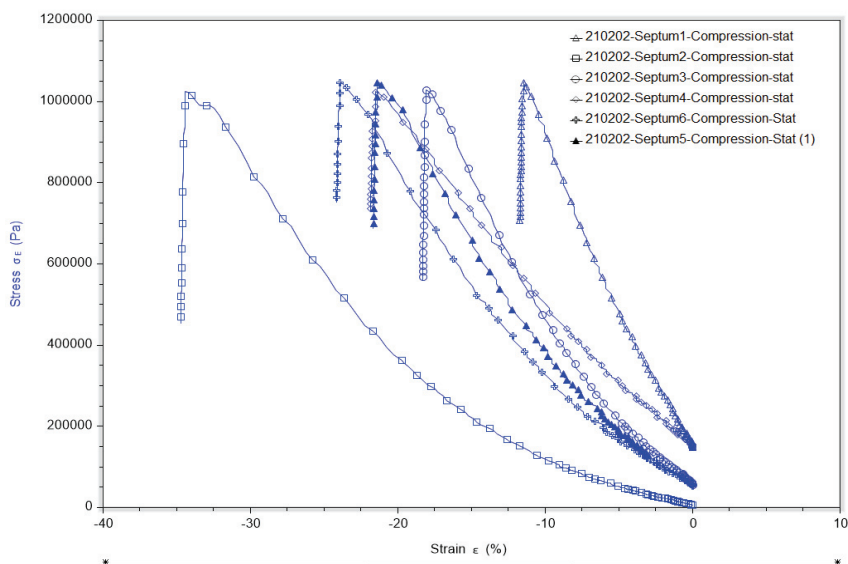


Figure 38 : Diagramme d'expression de la déformation du cartilage en fonction de l'intensité de la compression exercée.

Résultats : Le cartilage se comporte comme un matériau isotrope homogène. Le cartilage se déforme progressivement, puis se fracture à l'application d'une compression de l'ordre de 10^6

Pa. Les résultats sont très reproductibles, car cette valeur est retrouvée sur tous les échantillons. On réussit ainsi à caractériser le spectre visco-élastique du cartilage.

Conclusions : Le module d'Young du cartilage est de l'ordre de 10^7 Pa. Il s'agit donc de la valeur mécanique de référence qui devra être atteinte par les construits.

R.2.2.- Développement d'un scaffold de taille réelle inspiré de la technique de septoplastie extracorporelle.

Quand le cartilage septal est abimé dans la zone du L de Killian, mais présent à la partie profonde de la cloison, la technique de septoplastie extracorporelle est indiquée. Elle consiste à utiliser les parties qualitatives résiduelles du septum nasal, ou des fragments de cartilage costal pour les positionner dans les zones de la cloison à reconstruire, après un travail extemporané sur la table d'opération. Plusieurs greffons de cartilage taillés dans le cartilage résiduel sont assemblés pour former une équerre capable de remplacer le cartilage déficitaire, pour rendre au nez sa forme et sa fonction.

Il a été expliqué dans le chapitre traitant des techniques actuelles de chirurgie, que la partie postéro-inférieure du cartilage nasal n'a pas de valeur morphologique, et qu'il n'est pas nécessaire de la remplacer. Les greffons spreader grafts viennent élargir le cartilage reconstruit au niveau de l'arête dorsale, et maintiennent les cartilages triangulaires au niveau des faces latérales du nez. Cet élargissement permet un emboîtement du cartilage reconstruit dans le nez natif pour que le montage soit stable.

Une prothèse de septum obtenue par ingénierie tissulaire doit donc reprendre cette forme en équerre, posée en appui sur l'épine nasale antérieure, et venant reconstituer l'arête nasale jusqu'aux os propres du nez. Elle doit être discrètement élargie au niveau de l'arête nasale pour se stabiliser transversalement et assurer le rôle de soutien des cartilages triangulaires, sans pénaliser le flux respiratoire qui emprunte un passage proche du plancher des fosses nasales.

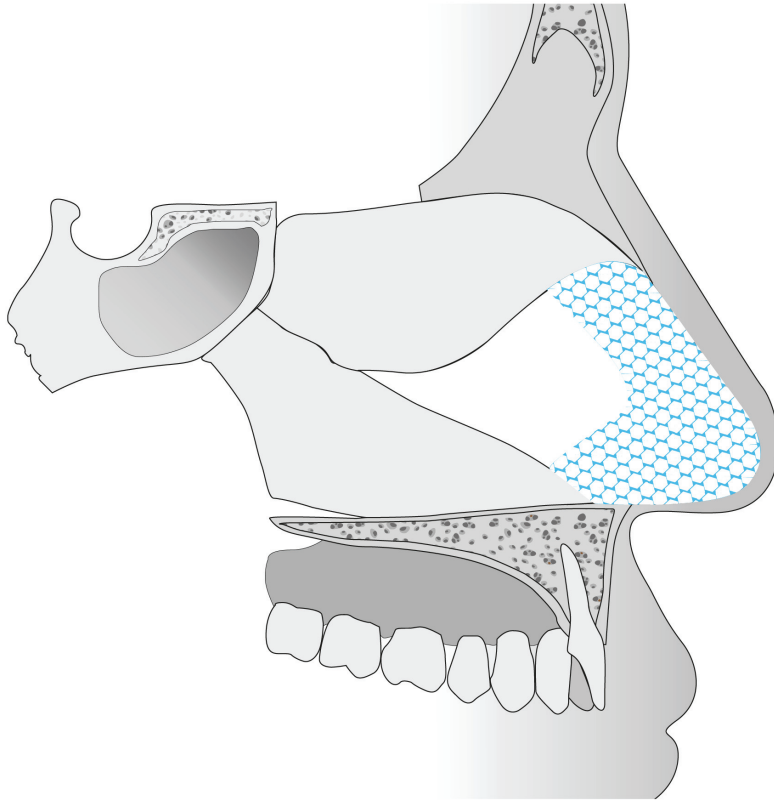


Figure 39 : Projection du principe du L de Killian avec une prothèse de septum nasal dont le scaffold serait un biomatériau structuré en maille pour obtenir une porosité. Figure originale Dr Vertu-Ciolino.

Les dimensions souhaitables de la cloison reconstruite ont été étudiées dans un article du service d'ORL à l'hôpital Édouard Herriot (41). La conclusion de l'étude est qu'un "one size fits all" (une taille convient à tout le monde) est possible, car les variations de taille de l'équerre septale sont modérées. Ainsi, nous avons choisi de développer une seule taille de prothèse pour l'étude d'ingénierie tissulaire du cartilage nasal. Néanmoins, la technologie de l'impression 3D qui est utilisée, doit permettre avec facilité de faire évoluer la prothèse à l'avenir avec application d'un coefficient multiplicateur sur le scaffold, en conservant les angles et les proportions proposées par la technique de septoplastie extracorporelle.

R.2.2.1. Design du scaffold de taille réelle.

Le design a été inspiré par la technique chirurgicale, et a dû répondre à l'impératif d'impression du scaffold à plat, car le silicone est un matériau qui reste partiellement fluide pendant

l'impression, ce qui expose le construit au phénomène de déformation par coulage de la matière. La forme définitive est stabilisée à la fin du processus d'impression, par une étape de réticulation par apport de chaleur (hydrosilylation).

Un plan technique a été déposé au service de Dessins et Modèles de l'INPI (Institut National de la Propriété Industrielle).

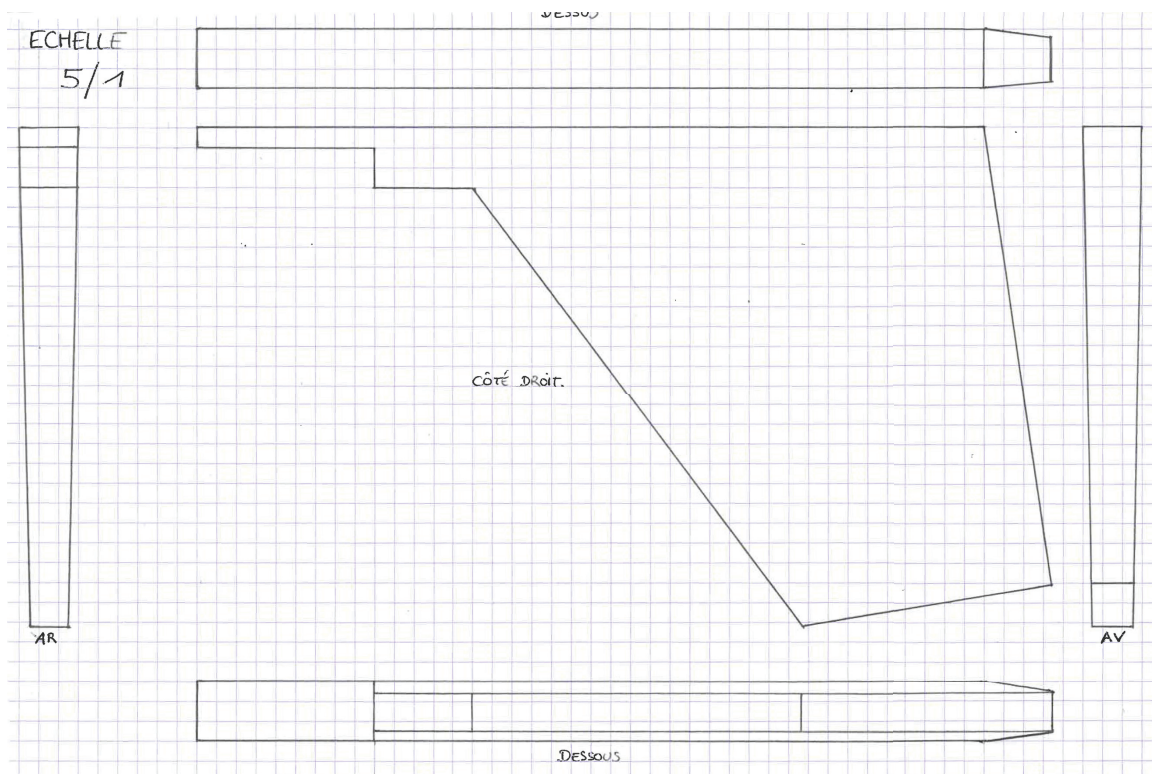


Figure 40 : Plan technique du scaffold de la prothèse de cloison nasale déposée à l'INPI. Propriété intellectuelle Dr Vertu-Ciolino.

Le scaffold mesure 40 mm de longueur par 25 mm de hauteur maximale. Son épaisseur est de 3 mm d'épaisseur au niveau de l'arête nasale, et de 2 mm au niveau du plancher nasal, pour optimiser le passage du flux aérien.

Un certificat d'identité a été publié au Bulletin Officiel de la propriété industrielle n° 21/22 du 29 octobre 2021.

⑫ N° (s) d'enregistrement ou national : 2021 2224

⑬ Dépôt du 5 mai 2021, à 92 INPI - Démarche en ligne
Nombre total de dessins ou modèles : 1
Nombre total de reproductions : 4

⑭ Déposant(s) :
Vertu-Ciolino Delphine, Hôpital Edouard Herriot, 5 place
d'Arsonval, Pavillon U 69003 LYON

⑮ Mandataire ou destinataire de la correspondance :
Vertu-Ciolino Delphine, Hopital Edouard Herriot Pavillon U, 5 place
d'Arsonval, 69003 LYON

Modèle(s) publié(s)

⑯ Classement
24-03

⑰ N° (s) de publication :
1 075 330 à 1 075 333

⑱ Nature du (des) produit(s) : Prothèse de septum nasal
D.M. n° 1 : 4 repr.

⑲ Date de publication : 29 octobre 2021

⑳ Description : Repr. 1-1 : Prothèse de septum nasal pour reconstruction chirurgicale du nez ou de la cloison nasale. ♦ Repr. 1-2 : Prothèse de septum nasal pour reconstruction chirurgicale du nez ou de la cloison nasale. ♦ Repr. 1-3 : Prothèse de septum nasal pour reconstruction chirurgicale du nez ou de la cloison nasale. ♦ Repr. 1-4 : Prothèse de septum nasal pour reconstruction chirurgicale du nez ou de la cloison nasale.



Figure 41 : Certificat d'identité du modèle de scaffold de prothèse de septum nasal.

Déposant : Dr VERTU-CIOLINO.

Numéro d'enregistrement national : 2021 2224.

À partir de ce dessin technique, un modèle a été généré pour le logiciel d'impression 3D.

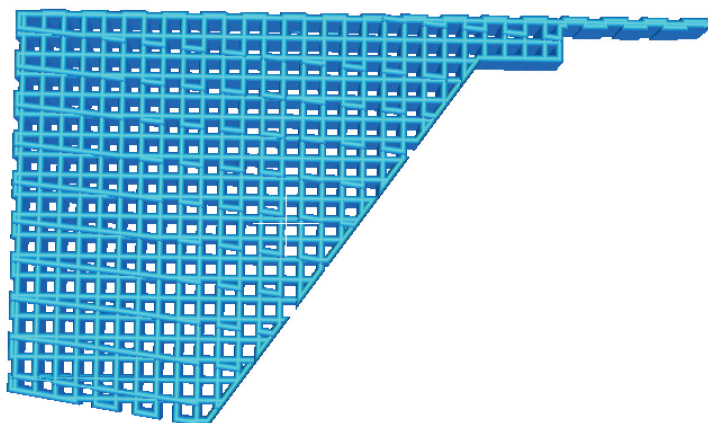


Figure 42 : Modélisation informatique du scaffold de taille réelle en vue de profil, avec structuration en mailles par la technique FDM (Filament Deposition Modeling) en impression 3D.

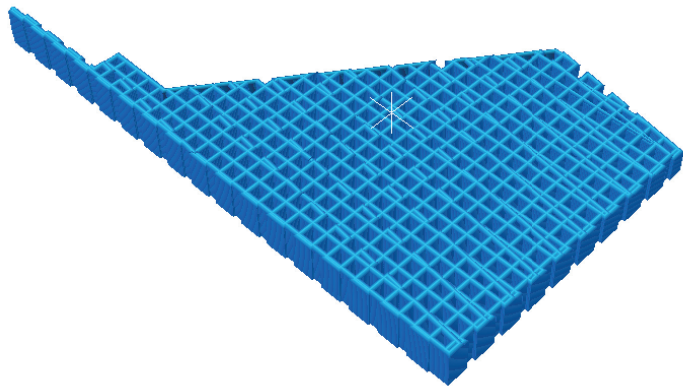


Figure 43 : Modélisation informatique du scaffold de taille réelle en vue de 3/4.

R.2.2.2. Tests d'imprimabilité et adaptations liées au modèle.

La production de prototypes de scaffold à taille réelle a été lancée, avec des aller-retours vers les mesures DMA pour atteindre des valeurs du module d'Young comparables à celle du septum cartilagineux natif.

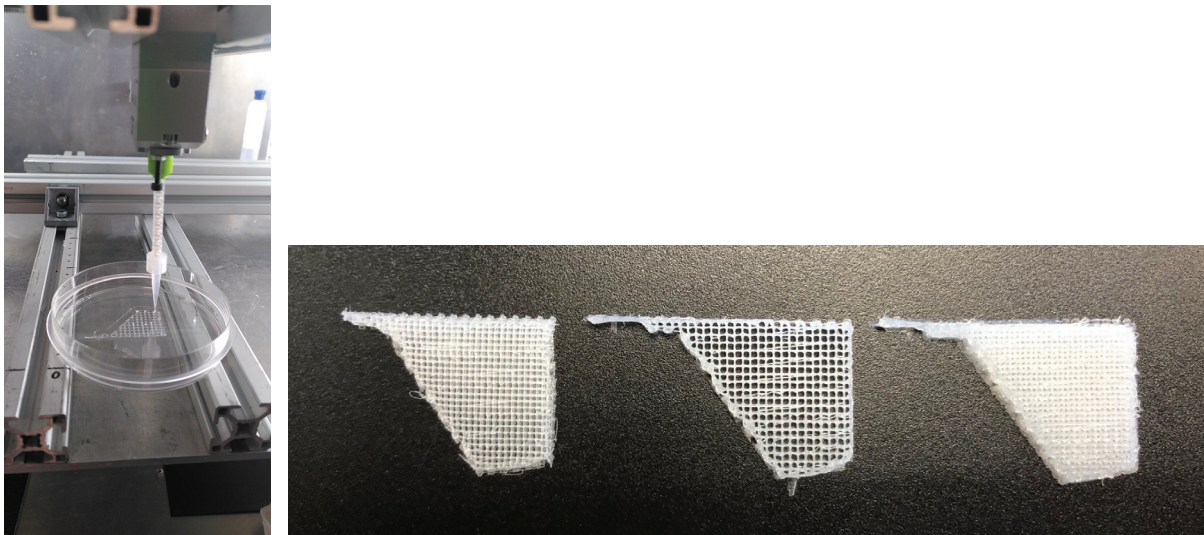


Figure 44 : Élaboration de plusieurs prototypes de densité variable. Certaines densités entraînaient un coulage trop important de la matière avec oblitération des pores sur la face au contact du plateau d'impression, pour laquelle le délai avant la réticulation était le plus long.

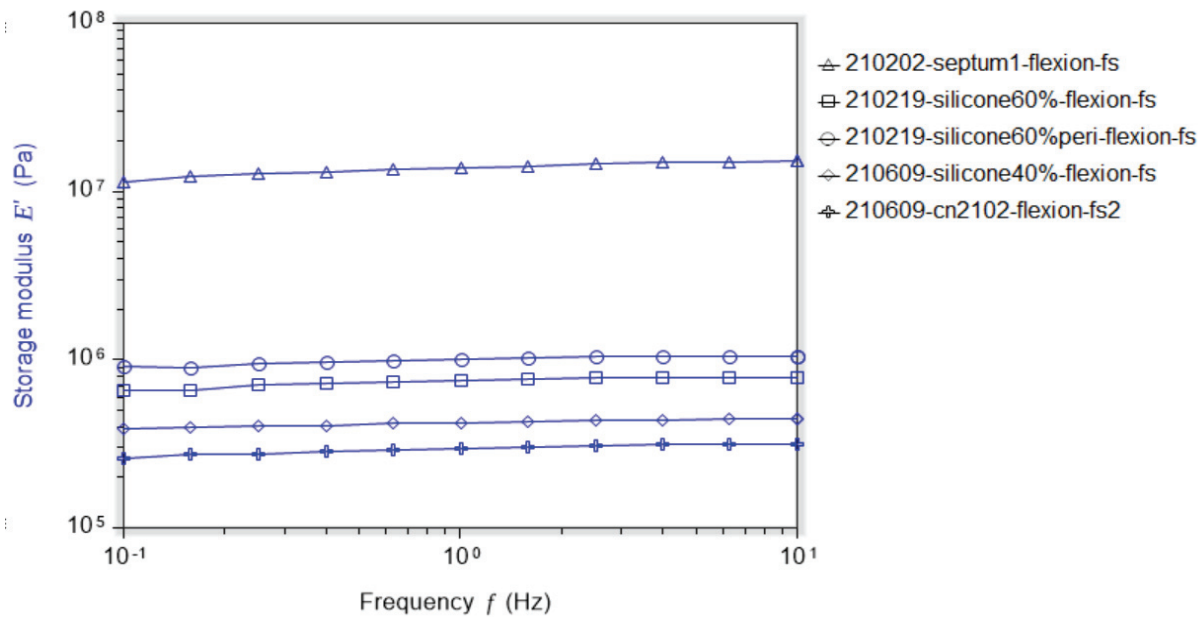


Figure 45 : Diagramme d'expression du module d'Young (Storage Modulus E) en fonction de la force appliquée en flexion 3 points (Frequency f), sur les prototypes de taille réelle et de densités différentes (silicone60%, silicone60%peri, silicone40%), ainsi que sur un prototype recouvert de gel de fibrine (cn2102), avec comparaison au résultat à un septum natif (Septum1). Le module d'Young diminue avec le remplissage à 40%, et diminue encore quand le prototype est recouvert de fibrine. Ces premiers prototypes réalisés en Silicone MED-4850 ont un module d'Young 10 fois plus faible que celui du septum natif (10⁶ Pa versus 10⁷ Pa).

Conclusions : Les résultats obtenus montrent que le module d'Young n'est pas atteint avec le Silicone MED-4850, et reste trop faible en comparaison avec les valeurs des septums natifs.

La structuration en maille a permis de tester un remplissage des prototypes à 40% ou 60% de matière. Le remplissage à 60% atteint les valeurs les plus élevées, mais le module d'Young reste environ 10 fois plus faible que celui du septum natif. Pour respecter les paramètres d'impression qui contrôlent la porosité de la structure, et atteindre les valeurs-cibles du module d'Young, il a été décidé de faire varier la dureté du matériau (Shore).

Ces résultats ont nécessité de choisir un silicone permettant d'atteindre un module d'Young proche de celui du septum natif par une échelle de Shore adéquate. Le silicone LSR 4370 a été retenu, car il appartient à la même gamme que le MED-4850, donc toujours de grade médical, mais il a la particularité de pouvoir recevoir des additifs pour atteindre des valeurs mécaniques conformes. Il existe dans une large gamme de dureté (Shore), pour s'adapter aux besoins.

Conclusions : Les scaffolds de taille réelle sont donc imprimés avec le silicone LSR 4370, pour conserver la porosité déterminée au cours de la première partie grâce aux scaffolds centimétriques, et atteindre sur le plan mécanique des valeurs du module d'Young capable de mimer le comportement du septum humain natif.

R.2.3. Fabrication du construit à taille réelle.

Les scaffolds de taille réelle ont été imprimés avec un bon respect des paramètres du modèle théorique. Ce scaffold a bénéficié du développement d'un moule bivalve avec adaptateur LUER-LOCK pour l'injection de la fibrine et évent, pour permettre le coulage du gel de chondrocytes, avec un enrobage d'épaisseur calibrée.

Des tests DMA ont été pratiqués sur les scaffolds enrobés de gel de fibrine pour analyser les résultats mécaniques du construits de taille réelle.

La qualité de la matrice extracellulaire a été vérifiée après 3 semaines de culture in vitro par immunofluorescence sur le collagène de type II.

R.2.3.1. Élaboration du moule obtenu par impression 3D.

Un moule spécifique a été imprimé en 3D. Le matériau utilisé pour l'impression du moule est le VeroClear de CADVision, imprimé par une machine de jet d'encre OBJET PRO. Ce moule doit permettre de couler le gel de chondrocytes de façon régulière et calibrée sur toutes les faces du scaffold.

Il s'agit d'un moule bivalve pour permettre le démoulage, avec un joint silicone entre les deux parties pour éviter les fuites au moment du coulage. Un tunnel d'injection a été positionné dans l'épaisseur d'une partie du moule pour injecter à l'endroit le plus déclive, relié à un adaptateur LUER-LOCK pour recevoir la seringue de gel de chondrocytes. Un évent a été placé à la partie la plus haute, et restera libre au moment de l'injection. Les premières injections ont donc été réalisées avec un seul injecteur.

Les dimensions intérieures du moule s'adaptent exactement à celles du scaffold, en respectant un intervalle d'1 mm dans toutes les directions. Le scaffold est calé au centre du moule par un système de picots très fins qui le décolle sur toutes les faces, en laissant l'intervalle d'1 mm.

Le moule est testé avec un scaffold recouvert de fibrine seule, pour des essais de manipulations techniques et de démoulage.

Des évolutions techniques ont été nécessaires pour aboutir à un moule adapté. Les premiers essais ont montré des difficultés à répartir la fibrine sur les deux faces du scaffold, car le gel suivait un chemin préférentiel vers l'évent, avant d'avoir rempli la totalité du moule. Un deuxième tunnel d'injection a donc été créé dans l'autre partie du moule, pour permettre une injection simultanée sur les deux faces du scaffold avec deux seringues.

De plus, nous avons constaté la présence de bulles d'air captives à la partie haute du moule, et l'évent a été légèrement déplacé.

Enfin, le démoulage s'est avéré difficile car le gel restait collé dans le moule par endroits. Un traitement de surface du moule a été réalisé par karcher à jet d'eau pour le rendre mat.



Figure 46 : Moule bivalve de première génération avec tunnel d'injection décliné unique et évent positionné au point le plus haut.



Figure 47 : Résultats des premières injections avec la fibrine seule : Arrachement partiel du gel au démoulage et bulles d'air captives pendant l'injection, aboutissant à des zones du scaffold non couvertes par le gel.

Un moule de deuxième génération a été créé, avec les évolutions permettant de résoudre les différents problèmes.

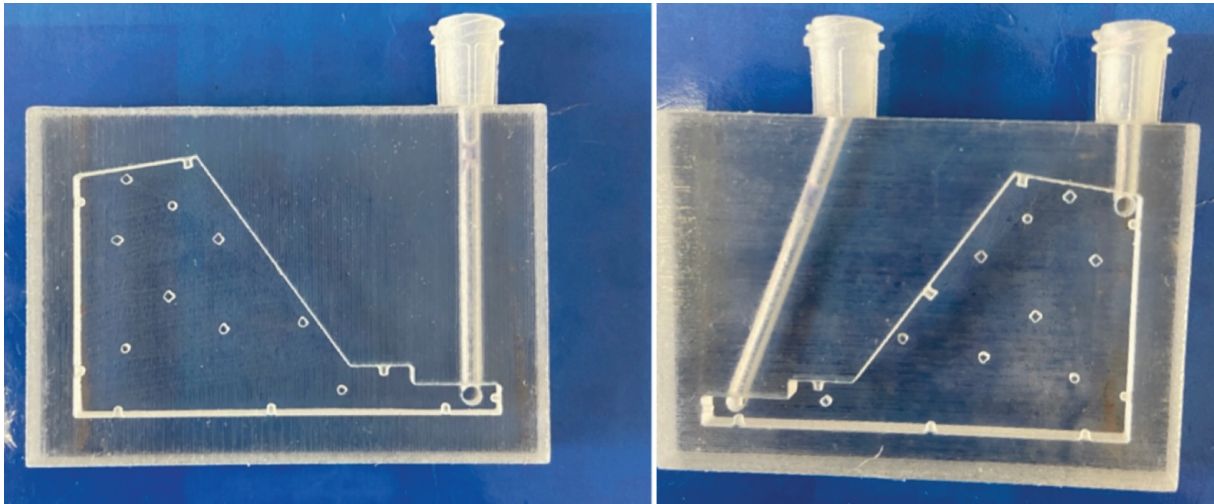


Figure 48 : Moule de deuxième génération avec double tunnel d'injection et modification de l'évent.

R.2.3.2. Analyses DMA sur les scaffolds recouverts de fibrine :

Les analyses DMA ont été répétées sur les construits recouverts du gel de fibrine. Les résultats ont montré que le module d'Young diminue avec le gel de fibrine. En effet, le gel de fibrine est fluide, donc le résultat de l'ensemble est plus faible que le résultat du scaffold seul.

Donc les propriétés mécaniques sont données par le scaffold seul.

R.2.3.3. Élaboration d'un construit à taille réelle avec coulage d'un gel de chondrocytes sur le scaffold dans le moule adapté.

4 construits ont été fabriqués avec des chondrocytes de 4 donneurs différents.

Les chondrocytes ont été extraits puis amplifiés selon le protocole du laboratoire, qui a montré de bons résultats avec le scaffold centimétrique de silicone recouvert d'un gel de fibrine chargé de chondrocytes.

Les chondrocytes obtenus en fin d'amplification ont été mis dans le gel de fibrine, puis le gel a été coulé dans le moule contenant le scaffold.

Après démoulage, les scaffolds sont placés en milieu de culture pour une durée de 3 semaines, selon le protocole validé par des résultats préliminaires obtenus par l'équipe.

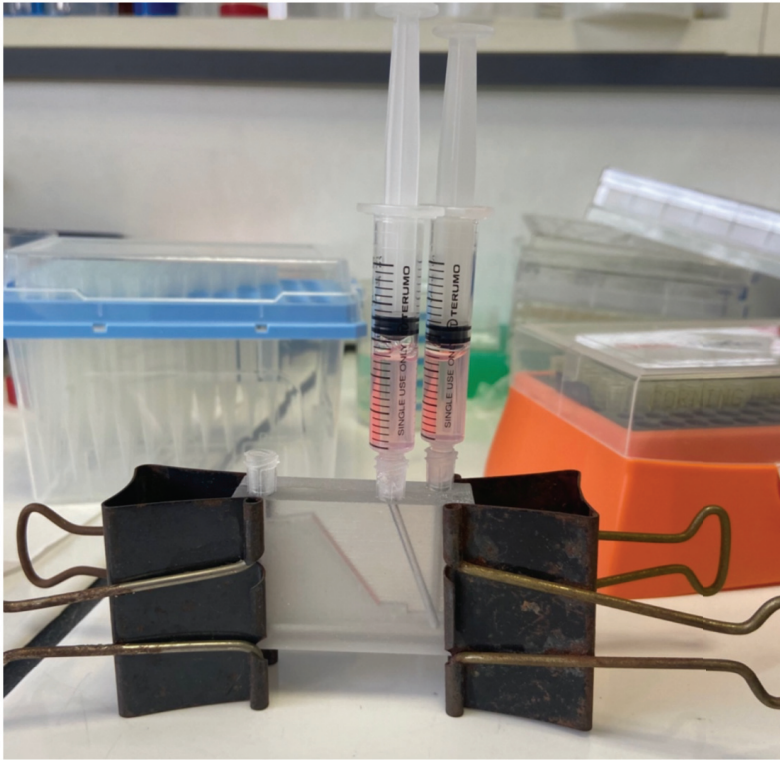


Figure 49 : Montage des seringues de gel de fibrine et de chondrocytes sur les injecteurs LUER-LOCK de chaque valve du moule, avec l'évent libre à la partie la plus haute du moule.

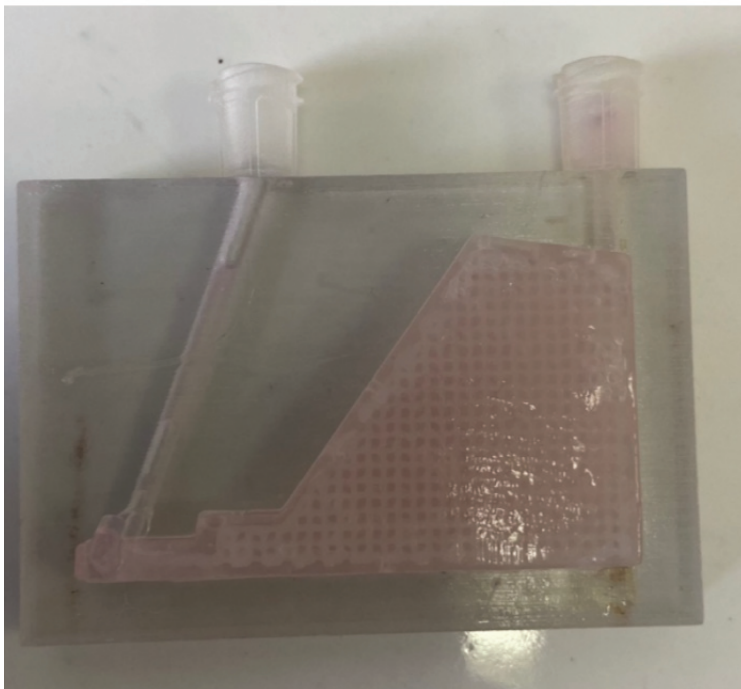


Figure 50 : Le construit est laissé pendant 30 mn dans le moule avant le démoulage, pour laisser la fibrine coaguler. La photo représente le moule ouvert.

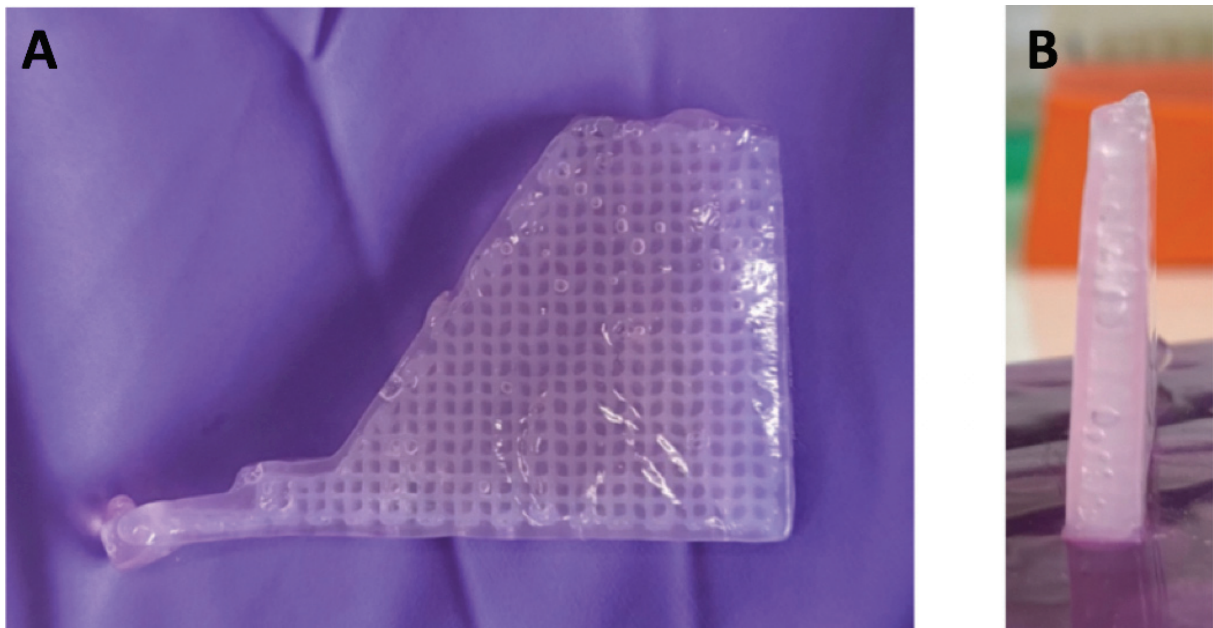


Figure 51 : Observation du construit de taille réelle après démoulage. A : en vue de profil. B : en vue de côté. On note l'enrobage présent sur l'ensemble du scaffold, avec une épaisseur calibrée et homogène.

R.2.4. Culture in vitro pendant 3 semaines puis vérification de la viabilité cellulaire et de la qualité de la matrice extracellulaire.

La culture des construits a été réalisée selon le protocole du laboratoire avec un milieu enrichi en cocktail chondrogénique BIT pendant 3 semaines in vitro.

La viabilité cellulaire a été testée par un test LIVE/DEAD.

La qualité de la matrice extracellulaire a été analysée par immunofluorescence du collagène de type II.

R.2.4.1. Analyse de la viabilité cellulaire par test LIVE-DEAD.

Le test est réalisé selon le protocole.

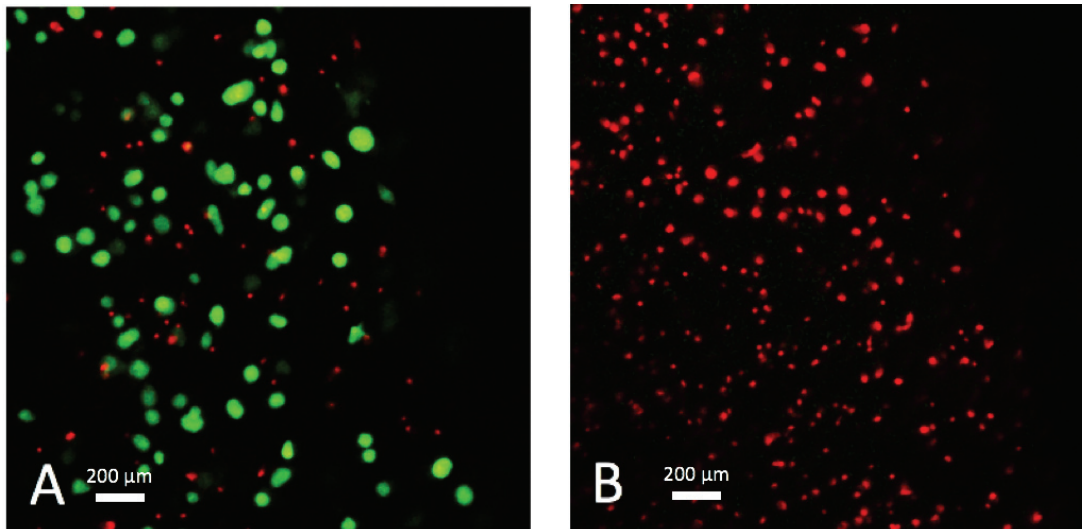


Figure 52 : Observation au microscope des résultats du test LIVE/DEAD.

A : L'échantillon n'a pas reçu de DMSO. La majorité des cellules sont vivantes.

B : L'échantillon a reçu du DMSO, toutes les cellules sont mortes.

La viabilité cellulaire est bonne dans tous les fragments de construits prélevés.

R.2.4.2. Analyses par immunofluorescence du collagène de type II.

Ces analyses ont pour but de vérifier la répartition des chondrocytes dans le gel de cartilage, et de visualiser la formation de la matrice extracellulaire de type chondrocytaire.

Les observations sont réalisées au microscope confocal Spinning Disk inversé (Leica, Yokogawa), au microscope confocal inversé AxioObserverZ1 LSM800.

Les construits sont découpés en fragments prélevés soit sur une berge pour voir l'enrobage, soit au centre pour essayer d'observer le remplissage des mailles de la structure et l'ancrage du gel sur le matériau.

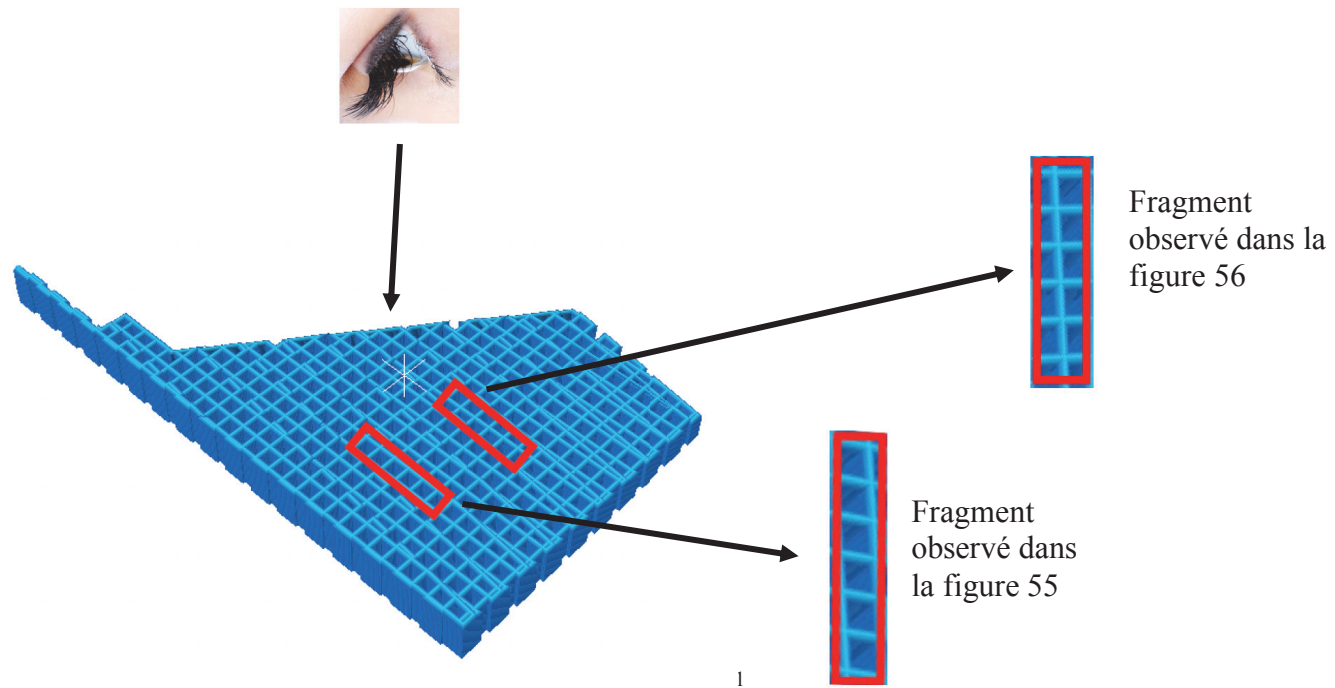


Figure 53 : Schéma de la position des fragments prélevés sur les construits pour réaliser les analyses en immunofluorescence.

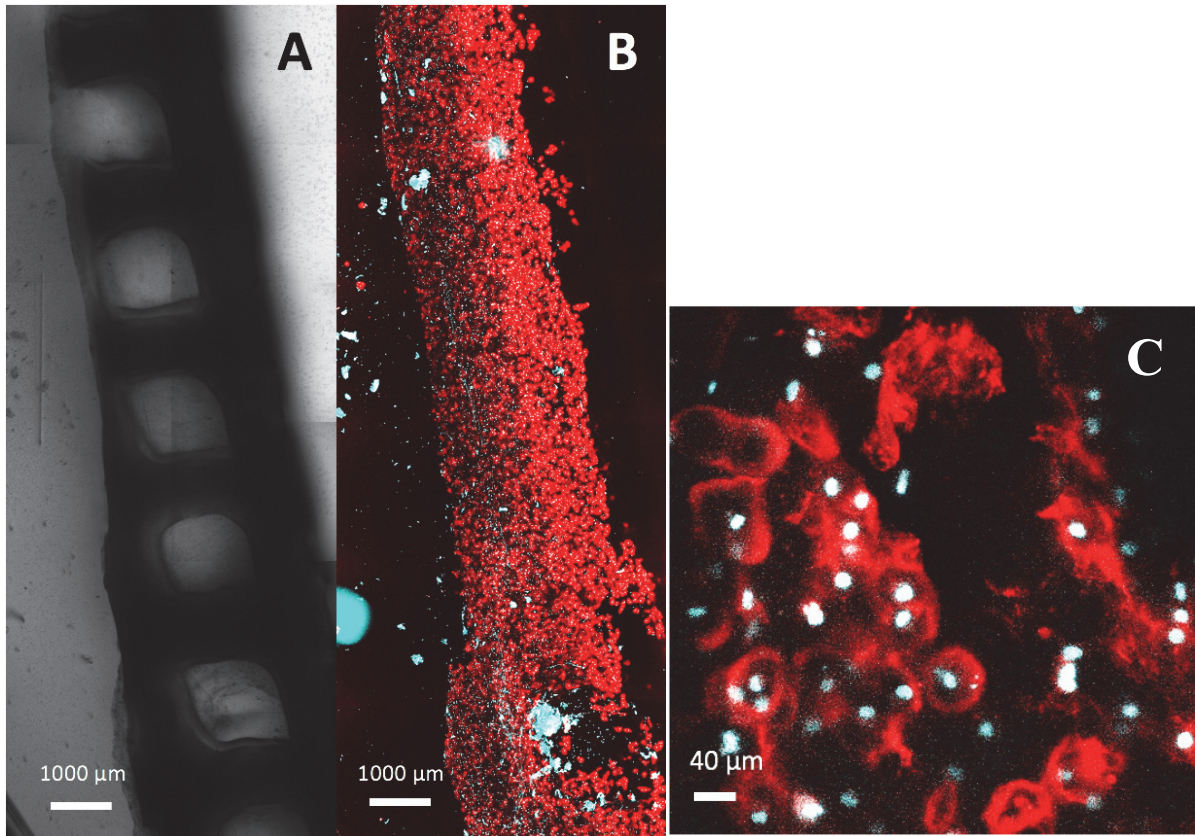


Figure 54 : Observation d'un fragment isolé du construit selon le schéma sus-jacent. L'observation est réalisée en surface en vue de dessus. On peut voir les pores qui traversent la structure.

A, B : Image-mosaïque reconstruite par juxtaposition de 10 champs de visualisation obtenus par microscopie confocale (A : Fond clair ; B : Immunofluorescence du collagène de type II)
 C : Observation à fort grossissement.

A

B

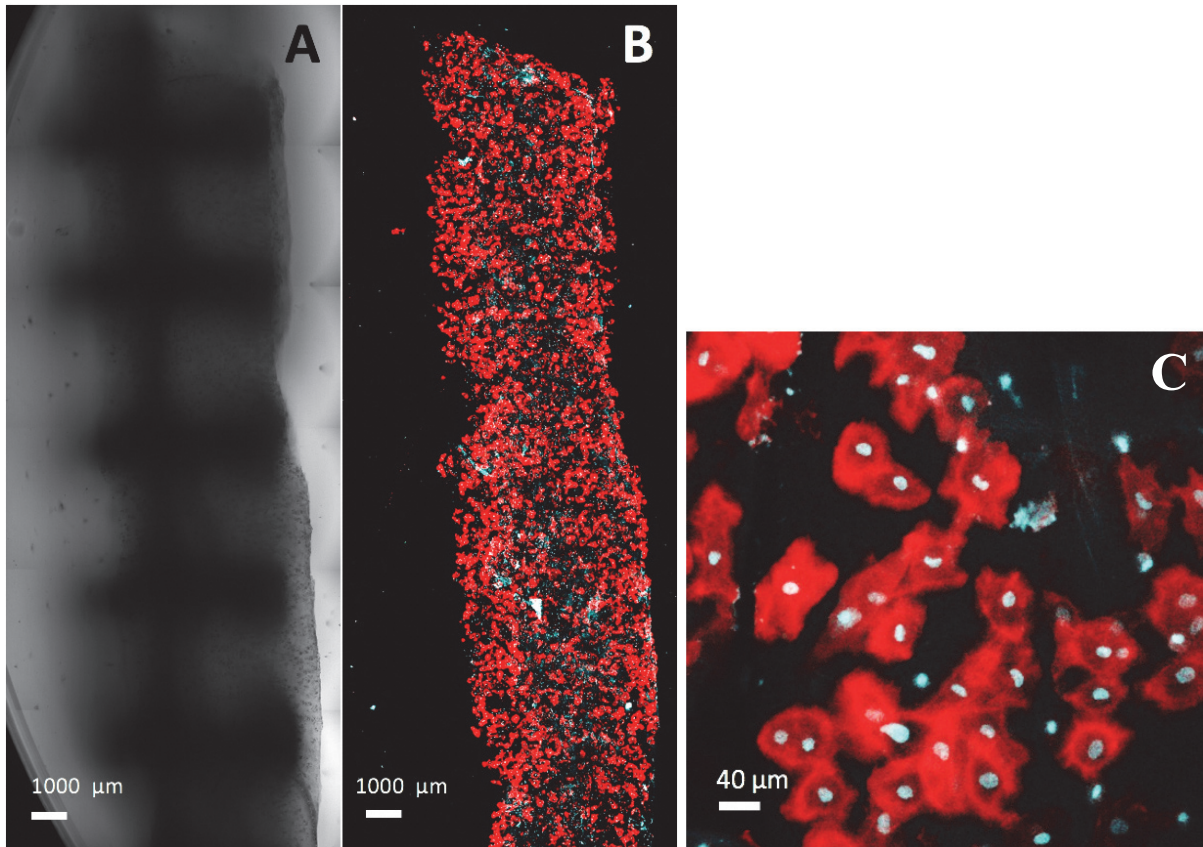


Figure 55 : Observation d'un 2ème fragment isolé du construit selon le schéma sus-jacent. L'observation est réalisée en surface en vue de dessus. On peut voir les pores qui traversent la structure.

A, B : Image-mosaïque reconstruite par juxtaposition de 10 champs de visualisation obtenus par microscopie confocale (A : Fond clair ; B : Immunofluorescence du collagène de type II)

C : Observation à fort grossissement.

Discussion :

L'immunofluorescence permet de visualiser la qualité de la matrice extracellulaire, et la répartition des chondrocytes dans le gel de cartilage. Le marquage du collagène de type II est très abondant, et semble présent dans l'ensemble du gel sur les images en mosaïque. À l'échelle du scaffold, le marquage est très homogène, et bien qu'il ne s'agisse pas de résultats quantitatifs, il semble que la fabrication de matrice extracellulaire se fasse dans tous les secteurs de l'enrobage scaffold. Le collagène de type II est présent partout, ce qui permet de penser que les chondrocytes se sont bien redifférenciés au cours de la culture, et assurent désormais une sécrétion protéique caractéristique du cartilage. Néanmoins, il a été techniquement difficile de visualiser le marquage à l'intérieur des pores, pour des raisons d'arrachement du gel lors de la coupe, ou pour des raisons d'absence de pénétration du marqueur en profondeur du fragment. À fort grossissement, on voit de petites plages non marquées au collagène II, qui correspondent

à des zones probablement vides car il n'y a pas non plus de marquage de noyaux cellulaires. Il peut s'agir de fractures du gel au moment du découpage des fragments, ou à l'échelle cellulaire, d'une répartition un peu inhomogène des chondrocytes dans le gel de fibrine. On ne connaît actuellement pas le devenir de la matrice extracellulaire, car les tests d'implantation in vivo n'ont pas encore été réalisés. Il sera intéressant d'observer sur le long terme

R.2.5. Essai sur cadavre pour modèle clinique.

L'implantation dans le nez d'un cadavre a pour objectif de tester la manipulabilité de la prothèse construite par un chirurgien au cours d'une intervention chirurgicale, et la capacité à projeter la peau de la pyramide nasale en remplacement du septum cartilagineux natif.

À terme, l'implantation est prévue chez l'homme après 3 semaines de culture in vitro en salle blanche. La culture in vitro est une étape indispensable avant l'implantation, car les chondrocytes doivent impérativement se redifférencier après l'amplification, pour s'orienter vers la production d'une matrice cartilagineuse. Cette redifférenciation est permise par l'action chondrogénique du cocktail BIT.

Les essais in vivo avec la souris nude pour les scaffolds centimétriques et sur rats pour ceux à taille réelle (prévus) permettent de tester la tension de la peau sur les prototypes. Cependant, le prototype ne peut pas être positionné perpendiculairement par rapport à la peau des animaux, et le test ne reproduit donc pas le positionnement du septum nasal sous la peau du nez.

Il n'existe pas de modèle animal pour le nez humain, car il est particulier à l'homme.

Ainsi, les essais sur le cadavre gardent un intérêt, pour valider les dimensions de la prothèse construite, et s'assurer que sa résistance mécanique est correcte dans un premier temps.

D'autre part, le test opératoire sur cadavre permet de vérifier que le prototype construit est manipulable par un chirurgien, et conserve son intégrité au cours de l'intervention. À ce stade, la fibrine est partiellement remplacée par de la matrice extracellulaire, conformément aux résultats des tests en immunofluorescence, et l'enrobage du scaffold doit rester complet pour ne pas exposer le matériau sous-jacent.

L'essai a été réalisé au sein du laboratoire d'Anatomie de l'Université Rockefeller à Lyon. Le protocole de recherche a été déclaré auprès des instances responsables du laboratoire d'Anatomie, et a validé la charte Éthique concernant le respect des corps.

L'implantation a été réalisé en reproduisant une intervention chirurgicale de rhinoseptoplastie par voie ouverte. Il s'agit d'une intervention qui a pour but de réparer la forme du nez (rhino-) et la cloison (-septo) au cours d'une même intervention chirurgicale, puisque la forme et la fonction sont intimement liées dans le nez. La voie d'abord ouverte nécessite une incision cutanée entre les 2 narines, puis une dissection endonasale et sous-cutanée pour analyser les problèmes puis réaliser les gestes thérapeutiques.

Dans un premier temps, la cartilage septal natif a été déposé, comme cela est fait au cours d'une technique de septoplastie extracorporelle quand le septum natif est très altéré. La muqueuse est soigneusement préservée après son décollement du cartilage septal dans le plan sous-périchondral. Une ostéotomie de la racine du nez est réalisée au ciseau à os pour créer une encoche, comme dans la technique de septoplastie extracorporelle, ou le greffon modelant supérieur vient s'emboîter dans le nez osseux pour stabiliser la cloison reconstruite dans le nez natif.

La prothèse à taille réelle a été cultivé in vitro pendant 3 semaines en présence du cocktail chondrogénique pour permettre une redifférenciation comme cela a été montré par les tests d'immunofluorescence du collagène de type II. Un gel de cartilage recouvre le scaffold à taille réelle.

Dans un deuxième temps, la prothèse est introduite à la place du la cloison cartilagineuse native entre les deux feuillets muqueux, puis mise en position exacte pour reproduire la réparation de la région du L de Killian. Les rapports anatomiques avec le maxillaire et la racine du nez sont respectés. La peau nasale est rabattue pour voir si les reliefs de la pyramide nasale sont rendus par la mise en place de la prothèse. La perméabilité nasale est également analysée, grâce à des repères chirurgicaux habituels.

Des clichés photographiques du nez de profil sont réalisés avant la procédure, puis après la mise en place de la prothèse.

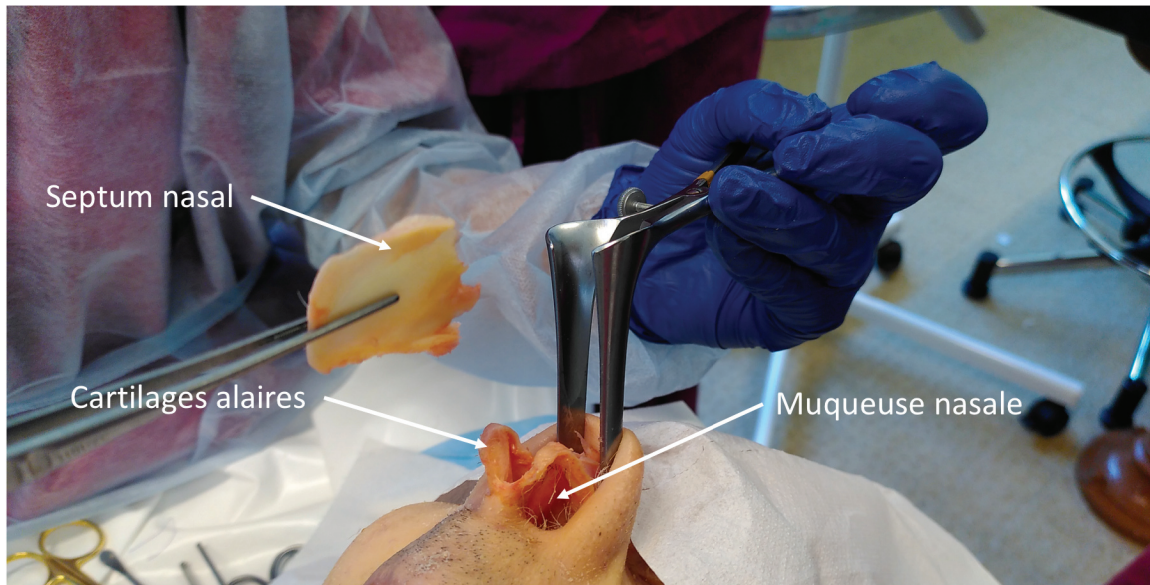


Figure 56 : Dépose du cartilage septal natif par une technique de voie externe utilisée en rhinoseptoplastie.

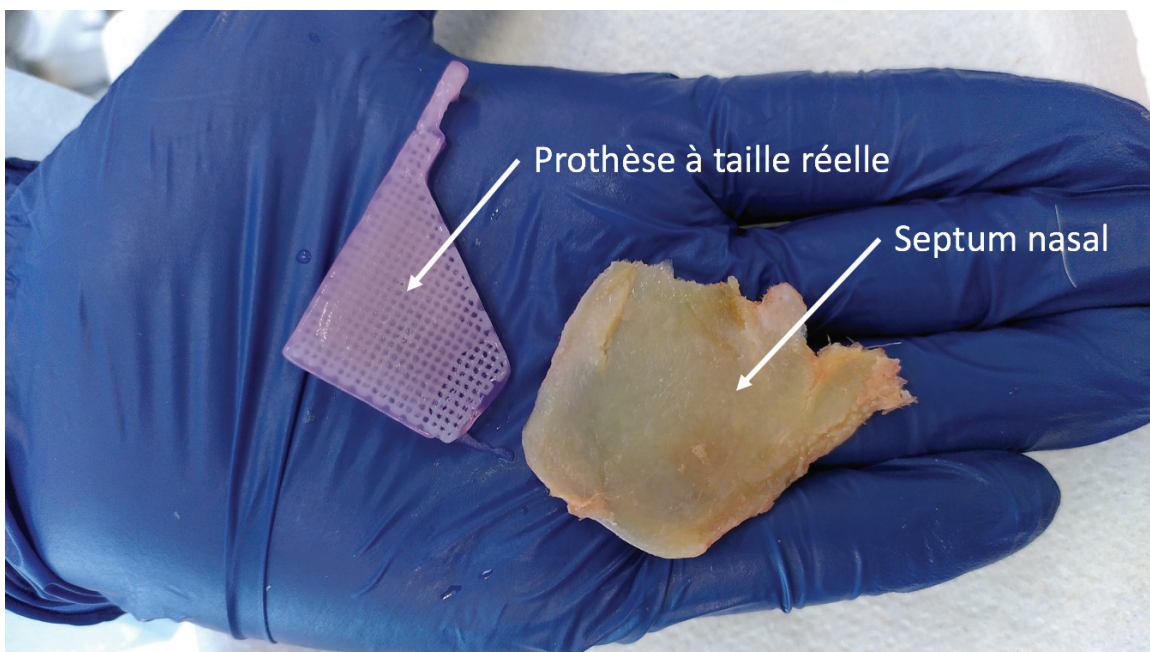


Figure 57 : Comparaison du cartilage natif et du construit à taille réelle. L'orientation est la même, mais la prothèse ne remplace pas la partie postéro-inférieure du cartilage. La congruence macroscopique est satisfaisante.

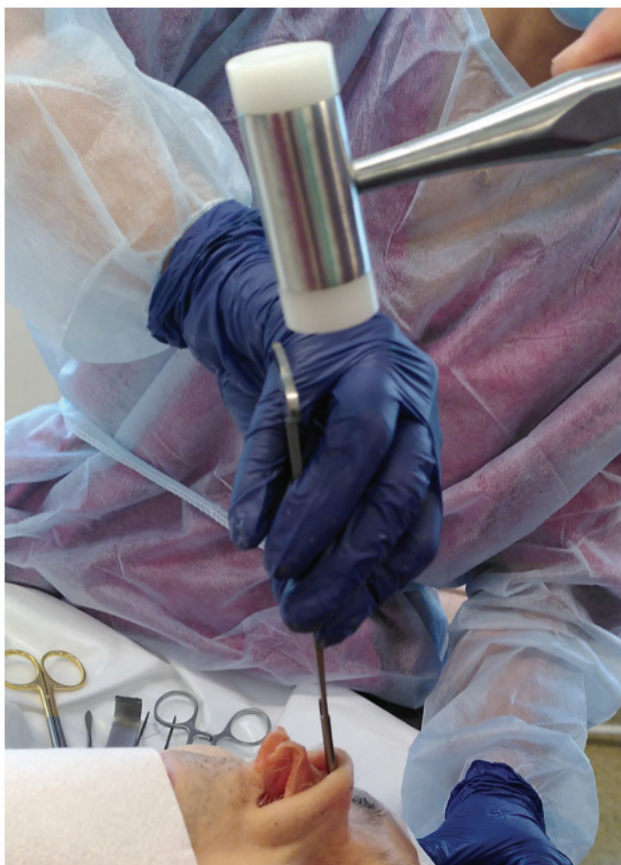


Figure 58 : Ostéotomie de la racine du nez pour créer une zone en tenon-mortaise où viendra s'emboîter le construit pour assurer son maintien en position anatomique.



Figure 59 : Insertion du prototype en position anatomique entre les 2 feuillets muqueux, en utilisant des instruments chirurgicaux habituels (écarteur de Killian dans le nez et pince d'Adson pour manipuler le construit).

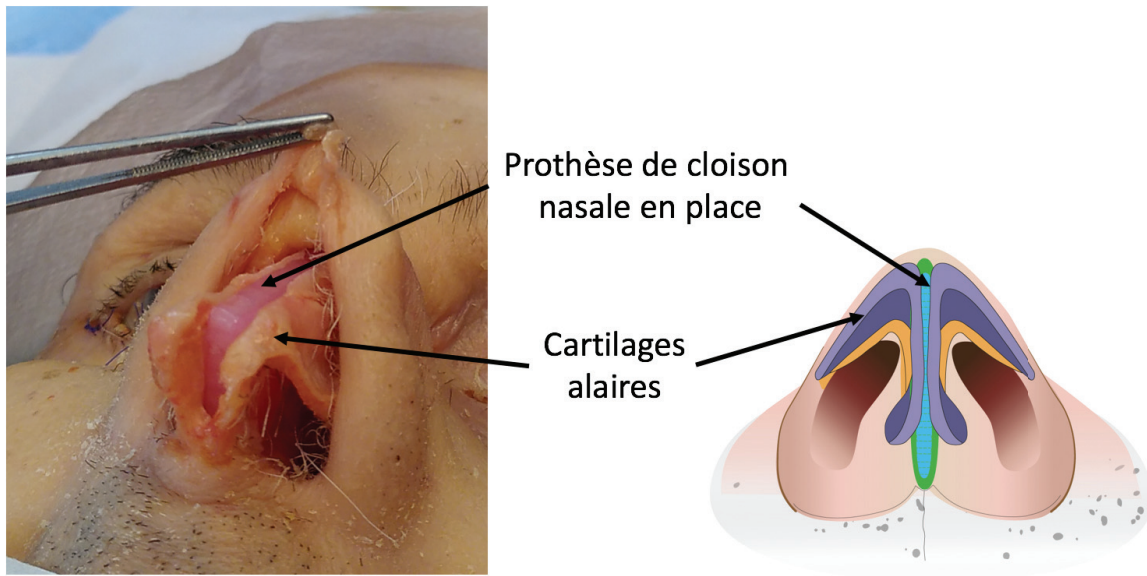


Figure 60 : Comparaison entre une photo et un schéma de l'implantation en vue basale (Figure originale Dr Vertu-Ciolino). La prothèse de cloison nasale reproduit les rapports anatomiques du septum natif.

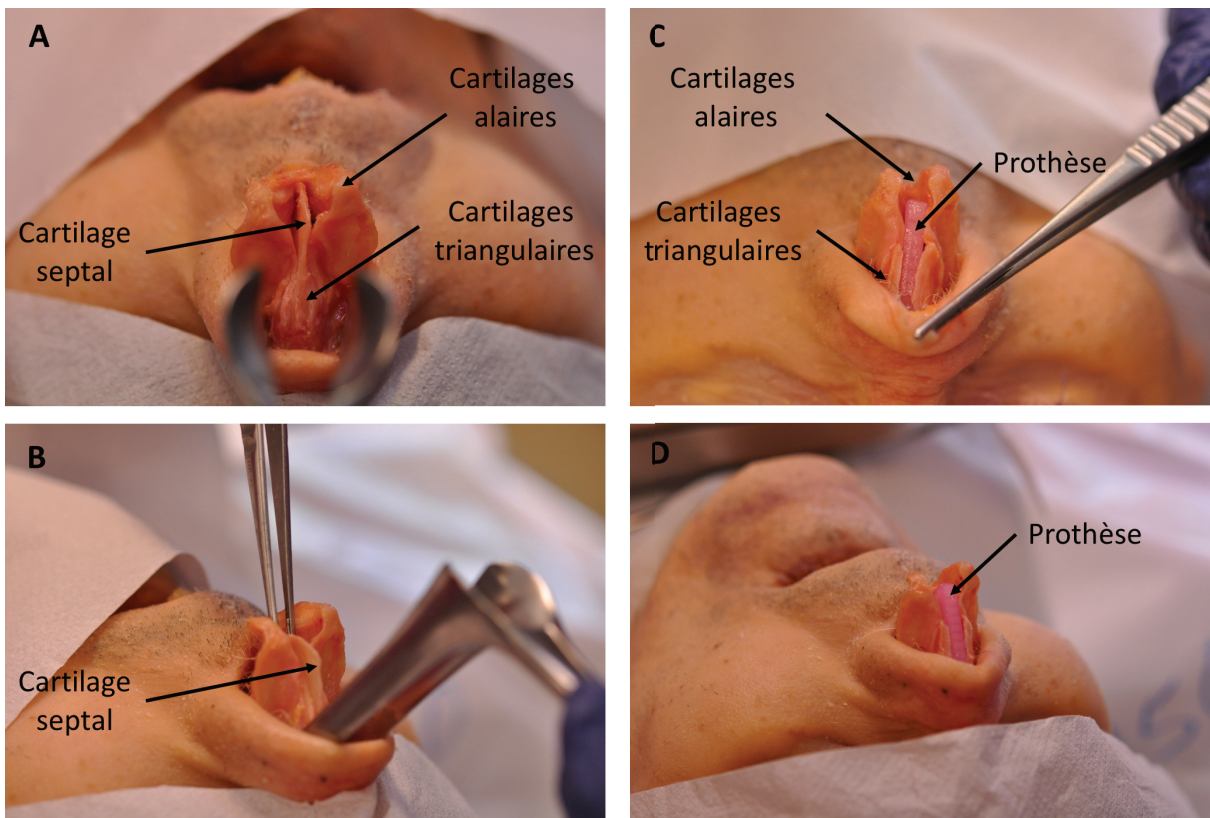


Figure 61 : Comparaison des rapports anatomiques entre le septum natif en place (A, B) et la prothèse de cloison en place (C, D). La prothèse soutient bien les cartilages alaires et triangulaires comme le septum natif.

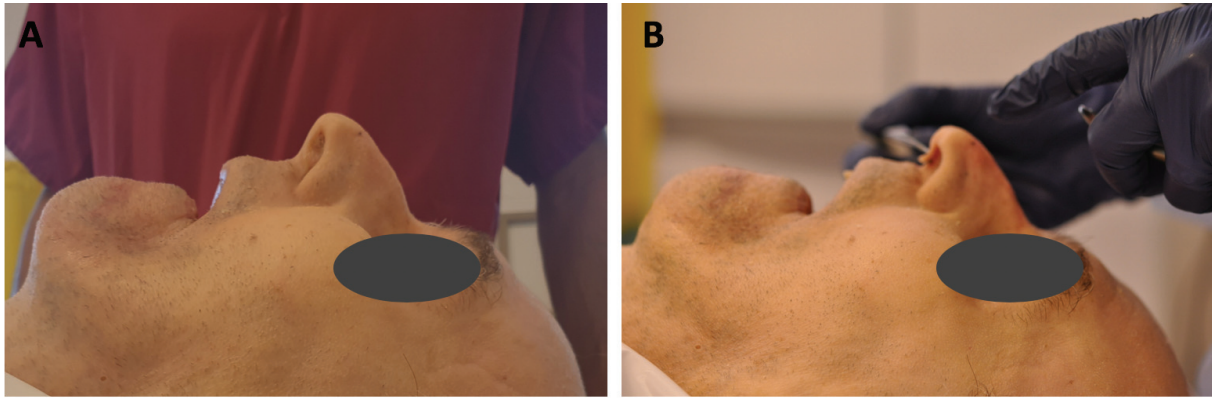


Figure 62 : Comparaison du profil initial du patient puis du profil avec la prothèse en place. La peau est rabattue pour évaluer cliniquement la restitution de la morphologie nasale initiale.

Ainsi, l'essai d'implantation sur cadavre en mimant une technique opératoire classique a été très satisfaisante.

Sur le plan de la manipulabilité par un chirurgien, le construit obtenu après 3 semaines de culture *in vitro* s'est montré suffisamment résistant. Le gel de cartilage est bien ancré au scaffold, et reste ferme lors de la préhension. La pince chirurgicale ne l'abîme pas. Il est possible de réaliser plusieurs manœuvres d'introduction et de retrait, comme cela est nécessaire pour vérifier le bon positionnement du septum reconstruit, sans dégâts marqués. Bien sûr, la manipulation doit être délicate. La zone la plus fine du construit qui vient se placer dans l'encoche ménagée dans la racine du nez, est la partie du construit qui subit le plus de frottement avec la peau au moment de l'introduction, et doit bénéficier d'une attention particulière.

Sur le plan de la capacité de la prothèse à reconstituer les rapports anatomiques avec les cartilages alaires et triangulaires, l'essai a permis de montrer que les dimensions du construit étaient adéquates. La restitution de la forme du nez et de la ligne de profil s'est révélée très bonne, et le soutien des faces latérales du nez indique la possibilité de lutter contre les problèmes de collapsus et de phénomènes de valve nasale. L'intégrité anatomique de la structure nasale est le garant d'une forme et d'une fonction réhabilitée.

Enfin, la prothèse en place entre les 2 feuillets muqueux repositionnés reconstitue une cloison dont l'épaisseur ne semble pas poser de problèmes d'étroitesse dans les fosses nasales, pour ne pas risquer d'abîmer la perméabilité en créant une obstruction nasale.

Le bilan de l'essai chez le cadavre est très encourageant pour les perspectives de recherche clinique et la poursuite de l'étude.

-Discussion générale et perspectives.

Nos travaux avaient pour objectif de vérifier la possibilité de développer un gel de cartilage à partir d'un hydrogel de fibrine et de chondrocytes nasaux humains, au contact de deux nouveaux matériaux imprimés en 3D avec une structure poreuse, puis de fabriquer une prothèse de cloison nasale humaine.

Les chondrocytes humains nasaux ont été retenus dans l'optique d'une utilisation de cartilage autologue chez les patients nécessitant une reconstruction du cartilage de la cloison nasale. Les chondrocytes nasaux peuvent être facilement obtenus à la demande du chirurgien par dons de résidus opératoires de patients opérés au niveau du nez, et ayant donné leur consentement pour la recherche. De plus, ils ont montré une meilleure capacité à s'amplifier que les chondrocytes articulaires, ce qui rend leur obtention relativement rapide et peu coûteuse.

La combinaison FI-BIT s'est montrée efficace pour obtenir l'amplification puis la redifférenciation des chondrocytes.

Cette combinaison associe FGF-2 et Insuline (FI) pour l'amplification des chondrocytes puis BMP-2, Insuline et T3 (BIT) pour la redifférenciation des chondrocytes. Liu et al. ont montré dès 2007 que cette combinaison était optimale avec des chondrocytes auriculaires en gel d'atélocollagène (38)(42). Ensuite, notre laboratoire a mené de nombreux essais avec des chondrocytes d'origine articulaire ou nasale, sur des supports variés comme les éponges de collagène (39)(40), le gel d'agarose associé au polyéthylène poreux (6), ou le gel de fibrine ou IEIK13(37)(7). Les résultats de ces différentes études ont montré la robustesse du protocole, qui s'est déjà révélé efficient dans toutes ces situations.

Les chondrocytes différenciés étant des cellules peu prolifératives, il est nécessaire de les amplifier afin d'en obtenir un nombre suffisant pour l'ensemencement sur des biomatériaux à une densité cellulaire qui correspondrait à celle du cartilage natif. L'amplification des cellules se fait en environnement bidimensionnel. Les chondrocytes extraits de cartilage nasaux sont adhérent au plastique de boîte de culture. Lors de la culture en environnement 2D, les chondrocytes adoptent alors une forme fibroblastique, entraînant une dédifférenciation. Les voies de signalisation et de synthèse protéique sont orientées vers la synthèse du collagène de type I. Après amplification et au moment de l'encapsulation des chondrocytes dans le biomatériau, la présence de BIT est nécessaire, pour la redifférenciation des chondrocytes, qui

présentent à nouveau une synthèse protéique où les collagènes de type II et IX sont plus abondants, ce qui est caractéristique du tissu cartilagineux. Un environnement tridimensionnel est favorable à la redifférenciation des chondrocytes. Cet environnement peut être fourni par des supports liquides tels que l'hydrogel de fibrine ou IEIK13, éventuellement associés à des supports solides tels que des éponges de collagène ou du polyéthylène poreux. Dans le cadre de ce projet, nous avons sélectionné l'hydrogel de fibrine pour sa disponibilité et sa biocompatibilité. En effet, la fibrine est une protéine, naturellement impliquée dans la coagulation sanguine, qui possède des sites de liaisons naturelles pour les récepteurs exprimés à la surface des cellules (dont le motif RGD qui lie certaines intégrines avec une haute affinité, promouvant ainsi l'adhésion cellulaire). Les hydrogels de fibrine permettent donc une forte interaction des cellules encapsulées telles que les chondrocytes, améliorant ainsi la cytocompatibilité du biomatériau.

L'utilisation du Porolay P60 et du Silicone MED-4850 a montré des résultats semblables en ce qui concerne la capacité des chondrocytes cultivés avec BIT à se redifférencier. En effet, à la fin de la culture avec BIT *in vitro* pendant 3 semaines, on observe une augmentation de l'expression des gènes *COL2A1* et de *COL9A1* au niveau de l'ARN par rapport aux contrôles, et une inhibition de l'expression de *COL1A1* en PCR. De même, après analyses en Western Blot, on observe une augmentation de la présence des collagènes de type II et de type IX, ainsi qu'une augmentation de Sox9 au niveau protéique. Or Sox9 est un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes codant pour des protéines présentes dans la matrice extracellulaire caractéristique du cartilage. Ainsi, tous ces éléments indiquent que le cocktail BIT a atteint l'objectif de redifférenciation chondrocytaire en présence de Porolay ou de MED-4850, et d'hydrogel de fibrine. Ces deux biomatériaux composites s'avèrent biocompatibles avec les chondrocytes et n'empêchent pas la production de la matrice extracellulaire caractéristique du cartilage. Les résultats enregistrés avec le construit à taille réelle avec le scaffold en silicone LSR 4370 sont aussi très favorables, et montrent une distribution homogène des cellules sur tout le gel recouvrant le scaffold, ainsi qu'une expression abondante de collagène de type II en immunofluorescence. Cela confirme que dans ces conditions aussi, la combinaison FI-BIT permet d'obtenir une amplification puis une redifférenciation des chondrocytes, qui conservent leur capacité à produire une matrice extracellulaire caractéristique du cartilage.

La structure en mailles poreuses pourrait être étudiée et optimisée pour améliorer le caractère tridimensionnel de l'environnement des chondrocytes.

D'après la modélisation théorique, le scaffold a un taux de remplissage de la matière de 40 %, laissant 60 % de vide au niveau des pores. Ce volume vide est disponible pour être rempli de gel de fibrine chargé de chondrocytes. Alors que le scaffold présente une surface bidimensionnelle à l'échelle de la cellule, l'encapsulation dans un hydrogel permettra aux chondrocytes d'être dans un environnement tridimensionnel. L'enrobage de gel autour du scaffold est aussi un environnement dans lequel les chondrocytes sont à distance suffisante de la surface du scaffold qui rendrait l'environnement bidimensionnel. Tout cet environnement est favorable à la redifférenciation des chondrocytes. Cependant, le caractère tridimensionnel de l'environnement est un élément insuffisant pour la redifférenciation, et l'action chondrogénique du cocktail BIT est indispensable. Actuellement, les analyses en immunofluorescence du collagène de type II réalisées en fin de culture montrent des cellules arrondies, qui semblent avoir une morphologie chondrocytaire, et ne semblent pas souffrir de la présence du biomatériau. Les essais d'implantation *in vivo* réalisés en fin de culture, coïncident avec l'arrêt de la présence du cocktail BIT pour les chondrocytes. Il est nécessaire que le phénotype chondrocytaire reste stable, avec des expressions géniques et des synthèses protéiques dirigées vers la fabrication d'une MEC de type cartilagineux. Le caractère tridimensionnel fourni par l'hydrogel de fibrine est un élément favorable pour stabiliser le phénotype, et éviter ainsi que des chondrocytes ne se dédifférencient, avec fabrication de tissu fibreux à la place du tissu cartilagineux.

Le gel de cartilage obtenu autour du scaffold doit permettre d'atteindre une immunotolérance du construit.

Actuellement, l'utilisation d'implants alloplastiques sous la peau du nez présente un fort taux de complications par rejet ou surinfection. Le rejet peut être mécanique par usure de la peau ou de la muqueuse en particulier au niveau des zones d'insertion de l'implant, ou lié à une surinfection suite à la formation d'un biofilm bactérien. L'ingénierie tissulaire cherche à fabriquer des implants tolérés par l'organisme, et protégés des infections et de la formation de biofilms. Le gel de cartilage formé autour du scaffold doit remplir ce rôle. Il est nécessaire que ce gel de cartilage reste intimement lié au scaffold de façon stable, puisque nous utilisons un scaffold non résorbable. La qualité de l'ancrage et la densité du gel de cartilage doit lui permettre de résister aux frottements de la peau et aux mouvements et traumatismes quotidiens du nez.

La question de la qualité de la matrice extracellulaire et de l'importance du phénotype chondrocytaire peut se poser dans notre concept. En effet, nous utilisons un scaffold non résorbable développé pour conférer au construit ses qualités mécaniques mimant le cartilage

natif. Ainsi, l'enrobage par le gel de cartilage n'est présent que pour camoufler le corps étranger que représente le matériau, pour éviter les réactions de rejet ou l'apparition d'un biofilm bactérien après contamination. La capacité des chondrocytes à produire une matrice extracellulaire abondante est nécessaire pour qu'elle remplace l'hydrogel de fibrine qui sert de support et qui sera progressivement résorbé. Il sera important de vérifier que la matrice extracellulaire devient confluyente pour assurer une couverture complète du scaffold.

Les avantages d'utiliser des chondrocytes restent nombreux, outre le fait de remplacer un tissu par un tissu identique de façon orthotopique. D'une part, les chondrocytes ont des exigences nutritionnelles faibles, et leur métabolisme habituel est peu élevé, puisqu'ils sont nourris par imbibition à travers la muqueuse nasale. La densité cellulaire reste faible dans le tissu construit. Ainsi, leur capacité à survivre après l'implantation du construit reste bonne dans ce contexte de greffe, qui est une situation où les apports nutritionnels aux cellules restent précaires surtout initialement. Le tissu construit ne doit pas se dégénérer dans l'intervalle de temps avant le rétablissement d'un réseau microvasculaire stable à l'interface entre la muqueuse et le gel de chondrocytes. D'autre part, le caractère très faiblement prolifératif des chondrocytes est un avantage pour conserver la forme du construit sans modifications de ses dimensions, ni tendance à envahir les tissus adjacents.

Il n'y a pas de modèle animal pour le nez humain.

Nos travaux ont permis d'obtenir un prototype de prothèse de cloison nasale cartilagineuse humaine. Or, le nez humain est spécifique dans sa structure cutané-cartilagineuse projetée. Le septum cartilagineux se positionne perpendiculairement au plan de la face, et applique une tension forte vers l'avant sous la peau du nez, en soulevant en même temps les cartilages des faces latérales du nez (alaires et triangulaires). Les primates n'ont pas de structure projetée en avant du massif facial, et une étude même avec des primates n'apporterait pas d'informations sur la tolérance de la peau au-dessus du construit en position anatomique. À ce stade, l'essai d'implantation dans le cadavre est le test qui a permis de valider la manipulabilité et la fiabilité du construit à taille réelle pour remplacer le septum natif. Cependant, aucune observation du construit en position anatomique dans un organisme vivant et sur le long terme n'a été possible. Les études sous la peau de la souris nude ont permis de vérifier la résistance du gel au frottement, avec le construit placé de façon parallèle à la peau. Des études sous la peau de mammifères plus grands devront être réalisées avec les construits de taille réelle. La résistance du tissu construit autour du scaffold est un enjeu majeur pour l'immunotolérance, car si le scaffold est dénudé, il devient accessible à une contamination qui pourrait entraîner le rejet. En

effet, l'épaisseur des téguments qui recouvrent la prothèse, que ce soit sur le versant cutané ou le versant muqueux, est faible, et son exposition pourrait survenir facilement par usure des tissus. La structure complexe des construits à taille réelle nécessite un modèle animal de grande taille. Cependant, l'usure qui pourrait se produire avec un construit parallèle à la peau du dos d'un rat, ne sera pas forcément représentative des contraintes qu'il aurait subi en position anatomique, entre les deux feuillets muqueux et placé perpendiculairement par rapport à la peau. La courbure du thorax du rat pourrait user beaucoup plus les angles des construits, comme cela s'est produit avec les angles des certains construits centimétriques dans la souris nude. Inversement, après mise en place de la prothèse à taille réelle dans le nez en remplacement de la cloison nasale défailante, le point le plus saillant sera placé au niveau de la pointe nasale, mais cette éventuelle difficulté n'est pas testée sous la peau du rat.

Vers l'application clinique et la fabrication d'un Médicament de Thérapie Innovante à Production Ponctuelle MTIPP..

À la suite de nos travaux, de nombreuses études restent à mener avec les construits à taille réelle. En particulier, une étude *in vivo* permettra de vérifier le comportement du gel autour du scaffold sous la peau d'un animal de taille suffisante. L'utilisation de rats est envisagée pour cette nouvelle étape. Ces études *in vivo* doivent aussi analyser la formation et la qualité de la MEC autour du scaffold, pour voir si le tissu reste caractéristique du cartilage, ou si une évolution vers la fibrose se fait. La durée du test *in vivo* doit être la plus longue possible, et nous envisageons une durée de l'ordre de 12 semaines. Les analyses devront porter sur la qualité du phénotype chondrocytaire et la qualité de la matrice extracellulaire, avec répétition des analyses à plusieurs moments tout au long de l'étude pour être capable de comparer l'évolution de la matrice. Cette étude d'implantation *in vivo* dans le rat nude peut aussi être le moyen de vérifier l'absence de circulation des chondrocytes humains dans l'organisme du rat, pour s'assurer de l'absence de biodistribution non souhaitée, ainsi que l'absence de tumorigénicité de notre biomatériau.

Comme nous l'avons déjà dit, l'absence de modèle animal pour le nez humain est un écueil, car il n'est pas certain que les tests sous la peau du rat soient représentatifs des contraintes présentes en position anatomique dans le nez humain. Nous avons essayé de surmonter ce problème, en réalisant un essai chez le cadavre avec une technique chirurgicale classique. La prothèse s'est montré très bien dimensionnée pour être implantée dans le nez, en reconstituant le soutien nécessaire pour soulever la voûte nasale et redonner la forme initiale du nez. Cet essai dans le

cadavre est un complément intéressant à l'implantation animale qui montre certaines limites dans notre cas.

Si les analyses de la qualité des construits et du comportement des chondrocytes sont favorables à l'issue de l'implantation chez le rat, il pourrait alors être possible de passer directement à un essai clinique chez un patient sélectionné, dans le cadre d'une nouvelle étude classée Recherche Incluant la Personne Humaine RIPH selon la loi Jardé. Certains patients en échec thérapeutique avec les chirurgies conventionnelles, ou les refusant en raison de leur lourdeur, pourraient choisir de bénéficier de la mise en place d'une prothèse de cloison nasale fabriquée avec des chondrocytes autologues, après une information médicale très précise et le recueil de leur consentement. Cette éventualité est possible car ces patients n'ont plus de possibilités thérapeutiques en dehors de l'épithèse. En cas d'évolution délétère après implantation de la prothèse de cloison nasale, la solution de l'épithèse reste possible, et le patient n'a pas subi de perte de chances.

Ainsi, le passage à l'essai clinique a été anticipé, car tous les verrous de la production d'une prothèse utilisable chez l'humain sont maîtrisés. Tous les facteurs solubles utilisés pour l'amplification et la culture des chondrocytes dans le cocktail FI-BIT existent sous la forme de médicament. L'hydrogel de fibrine existe sous forme de colle biologique hémostatique disposant d'un marquage Dispositif Médical DM. Le silicone utilisé est de grade médical, et peut être imprimé en salle blanche dans le laboratoire 3d.FAB. Nous pouvons avoir l'accès à un laboratoire disposant d'une salle blanche à l'hôpital pour fabriquer le construit dans des conditions stériles et permettant l'implantation immédiate au bloc opératoire à la fin de la culture chez le patient sélectionné. La maîtrise de l'ensemble des verrous liés à l'ingénierie tissulaire du cartilage nasal pourrait permettre une application en recherche clinique à moyen terme.

Conclusion Générale.

Ainsi, la collaboration interdisciplinaire entre nos 3 équipes a permis de créer pour la première fois une prothèse biocompatible de la cloison nasale, en alliant la biologie cellulaire avec l'équipe CNRS ROAD, l'impression 3D avec l'équipe CNRS 3d.FAB, et la chirurgie avec les Hospices Civils de Lyon.

Le concept interdisciplinaire NASALTIS a été élaboré en mettant en commun nos domaines d'expertise spécifiques, pour imaginer une prothèse de cloison nasale au bénéfice des patients nécessitant une reconstruction du nez.

La sélection du matériau biocompatible utilisé pour le scaffold non résorbable a été menée en vérifiant l'efficacité du cocktail de facteurs solubles chondrogénique sur des chondrocytes humains dans un hydrogel de fibrine, grâce à l'expérience de mon équipe. Ensuite, le design du scaffold destiné à la prothèse à taille réelle a été réalisé, inspiré par les techniques habituelles de chirurgie, qui nécessitent jusqu'à présent le prélèvement de greffons autologues au niveau d'un site donneur chez le patient. L'impression 3D du scaffold de la prothèse à taille réelle a été réalisée, et des tests mécaniques ont été pratiqués pour valider que la prothèse pouvait mimer les qualités mécaniques de la cloison nasale native, afin de rendre au nez sa forme et sa fonction. Enfin, des essais d'implantation chez la souris et chez le cadavre ont été menés pour vérifier la résistance du tissu construit, et la pertinence du modèle élaboré.

Désormais, de nouveaux tests *in vivo* doivent être menés, pour valider nos résultats sur une série plus grande, et sur une durée d'étude plus longue, avant l'étape de l'application en recherche clinique.

Bibliographie.

1. Constitution OMS 2020.
2. « Hippolyte Morestin », in: Aux médecins morts pour la Patrie (1914-1918). Hommage au corps médical français, Alcan et Lisbonne, Asselin et Houzeau, J.-B. Baillière et Fils, G. Doin, Masson et Cie, Poinat (Paris), 1922, p. 355,.
3. Noëlle Roubaud, R. N. Brahamet, Le colonel Picot et les Gueules Cassées, Nouvelles Éditions Latines, 1960, p. 75.
4. Stelter K, Strieth S, Berghaus A. Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology*. Dec 2007;45(4):325-31.
5. Kim HS, Park SS, Kim MH, Kim MS, Kim SK, Lee KC. Problems associated with alloplastic materials in rhinoplasty. *Yonsei Med J*. Nov 2014;55(6):1617-23.
6. Durbec M, Mayer N, Vertu-Ciolino D, Disant F, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E. Reconstruction du cartilage nasal par ingénierie tissulaire à base de polyéthylène de haute densité et d'un hydrogel. *Pathol Biol*. June 2014;62(3):137-45.
7. Dufour A, Buffier M, Vertu-Ciolino D, Disant F, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E. Combination of bioactive factors and IEIK13 self-assembling peptide hydrogel promotes cartilage matrix production by human nasal chondrocytes: ROLE OF SELF-ASSEMBLING PEPTIDE IN TISSUE ENGINEERING OF NASAL CARTILAGE. *J Biomed Mater Res A*. Avr 2019;107(4):893-903.
8. Edwards N. Septoplasty. Rational surgery of the nasal septum. *J Laryngol Otol*. Sept 1975;89(9):875-97.
9. McGrath M, Bell E, Locketz GD, Becker DG. Review and update on extracorporeal septoplasty. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. Fev 2019;27(1):1-6.
10. Kim IS. Augmentation Rhinoplasty Using Silicone Implants. *Facial Plast Surg Clin N Am*. Aug 2018;26(3):285-93.
11. Kumar V, Jain A, Atre S, Shome D, Kapoor R, Doshi K, et al. Non-surgical rhinoplasty using hyaluronic acid dermal fillers: A systematic review. *J Cosmet Dermatol*. Aug 2021;20(8):2414-24.
12. Rajzer I, Stręk P, Wiatr M, Skladzien J, Kurowska A, Kopeć J, et al. Biomaterials in the Reconstruction of Nasal Septum Perforation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. July 2021;130(7):731-7.
13. Suh MK, Lee KH, Harijan A, Kim HG, Jeong EC. Augmentation Rhinoplasty With Silicone Implant Covered With Acellular Dermal Matrix. *J Craniofac Surg*. March 2017;28(2):445-8.

14. do Amaral RJFC, Pedrosa C da SG, Kochem MCL, Silva KR da, Aniceto M, Claudio-da-Silva C, et al. Isolation of human nasoseptal chondrogenic cells: a promise for cartilage engineering. *Stem Cell Res.* March 2012;8(2):292-9.
15. Bleys RLAW, Popko M, De Groot JW, Huizing EH. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope. II. The perichondrial envelope of the septal and lobular cartilage. *Rhinology.* June 2007;45(2):153-7.
16. Bos EJ, Pluemeekers M, Helder M, Kuzmin N, van der Laan K, Groot ML, et al. Structural and Mechanical Comparison of Human Ear, Alar, and Septal Cartilage: *Plast Reconstr Surg - Glob Open.* Jan 2018;6(1):e1610.
17. Chang B, Reighard C, Flanagan C, Hollister S, Zopf D. Evaluation of human nasal cartilage nonlinear and rate dependent mechanical properties. *J Biomech.* 13 Feb 2020;100:109549.
18. Fertuzinhos A, Teixeira MA, Ferreira MG, Fernandes R, Correia R, Malheiro AR, et al. Thermo-Mechanical Behaviour of Human Nasal Cartilage. *Polymers.* 9 Jan 2020;12(1):177.
19. Patel K, Brandstetter K. Solid Implants in Facial Plastic Surgery: Potential Complications and How to Prevent Them. *Facial Plast Surg FPS.* Oct 2016;32(5):520-31.
20. Fabre H, Ducret M, Degoul O, Rodriguez J, Perrier-Groult E, Aubert-Foucher E, et al. Characterization of Different Sources of Human MSCs Expanded in Serum-Free Conditions with Quantification of Chondrogenic Induction in 3D. *Stem Cells Int.* 2019;2019:2186728.
21. Dufour A, Lafont JE, Buffier M, Verset M, Cohendet A, Contamin H, et al. Repair of full-thickness articular cartilage defects using IEIK13 self-assembling peptide hydrogel in a non-human primate model. *Sci Rep.* 25 Feb 2021;11(1):4560.
22. Yi HG, Choi YJ, Jung JW, Jang J, Song TH, Chae S, et al. Three-dimensional printing of a patient-specific engineered nasal cartilage for augmentative rhinoplasty. *J Tissue Eng.* 1 Jan 2019;10:2041731418824797.
23. Rajzer I, Kurowska A, Jabłoński A, Kwiatkowski R, Piekarczyk W, Hajduga MB, et al. Scaffolds modified with graphene as future implants for nasal cartilage. *J Mater Sci.* March 2020;55(9):4030-42.
24. Ruiz-Cantu L, Gleadall A, Faris C, Segal J, Shakesheff K, Yang J. Multi-material 3D bioprinting of porous constructs for cartilage regeneration. *Mater Sci Eng C. Avr* 2020;109:110578.
25. Chiesa-Estomba CM, Aiastui A, González-Fernández I, Hernández-Moya R, Rodiño C, Delgado A, et al. Three-Dimensional Bioprinting Scaffolding for Nasal Cartilage Defects: A Systematic Review. *Tissue Eng Regen Med.* June 2021;18(3):343-53.
26. Park SH, Yun BG, Won JY, Yun WS, Shim JH, Lim MH, et al. New application of three-dimensional printing biomaterial in nasal reconstruction. *The Laryngoscope.* May 2017;127(5):1036-43.

27. Kim DH, Lim MH, Jeun JH, Park SH, Lee W, Park SH, et al. Evaluation of Polycaprolactone-Associated Human Nasal Chondrocytes as a Therapeutic Agent for Cartilage Repair. *Tissue Eng Regen Med*. Dec 2019;16(6):605-14.
28. Fulco I, Miot S, Haug MD, Barbero A, Wixmerten A, Feliciano S, et al. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial. *The Lancet*. July 2014;384(9940):337-46.
29. Hashimdeen SH, Thorogate R, Miodownik M, Edirisinghe M. Fabrication of bespoke nasal septal scaffolds. *Materials and Design*. Jan 2016;90(403-409).
30. Rajzer I, Kurowska A, Jabłoński A, Jatteau S, Śliwka M, Ziąbka M, et al. Layered gelatin/PLLA scaffolds fabricated by electrospinning and 3D printing- for nasal cartilages and subchondral bone reconstruction. *Mater Des*. Oct 2018;155:297-306.
31. Xia H, Zhao D, Zhu H, Hua Y, Xiao K, Xu Y, et al. Lyophilized Scaffolds Fabricated from 3D-Printed Photocurable Natural Hydrogel for Cartilage Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 19 Sept 2018;10(37):31704-15.
32. Möller T, Amoroso M, Hägg D, Brantsing C, Rotter N, Apelgren P, et al. In Vivo Chondrogenesis in 3D Bioprinted Human Cell-laden Hydrogel Constructs: *Plast Reconstr Surg - Glob Open*. Feb 2017;5(2):e1227.
33. Sun H, Mei L, Song C, Cui X, Wang P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*. March 2006;27(9):1735-40.
34. Bagher Z, Asgari N, Bozorgmehr P, Kamrava SK, Alizadeh R, Seifalian A. Will Tissue-Engineering Strategies Bring New Hope for the Reconstruction of Nasal Septal Cartilage? *Curr Stem Cell Res Ther*. 26 March 2020;15(2):144-54.
35. Cao Y, Sang S, An Y, Xiang C, Li Y, Zhen Y. Progress of 3D Printing Techniques for Nasal Cartilage Regeneration. *Aesthetic Plast Surg [Internet]*. 26 July 2021; Disponible sur: <https://link.springer.com/10.1007/s00266-021-02472-4>
36. Oh YH, Seo JW, Oh SJ, Oum IT, Kim G, Kim J, et al. Correction of Severely Contracted Nose. *Plast Reconstr Surg*. Sept 2016;138(3):571-82.
37. Dufour, A.; Mallein-Gerin, F.; Perrier-Groult, E. Direct perfusion improves redifferentiation of human chondrocytes in fibrin hydrogel with the deposition of cartilage pericellular matrix. *Appl. Sci*. 2021, 11, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>.
38. Liu G, Kawaguchi H, Ogasawara T, Asawa Y, Kishimoto J, Takahashi T, et al. Optimal Combination of Soluble Factors for Tissue Engineering of Permanent Cartilage from Cultured Human Chondrocytes. *J Biol Chem*. July 2007;282(28):20407-15.
39. Claus S, Mayer N, Aubert-Foucher E, Chajra H, Perrier-Groult E, Lafont J, et al. Cartilage-characteristic matrix reconstruction by sequential addition of soluble factors during expansion of human articular chondrocytes and their cultivation in collagen sponges. *Tissue Eng Part C Methods*. Feb 2012;18(2):104-12.

40. Mayer N, Lopa S, Talò G, Lovati AB, Padeloup M, Riboldi SA, et al. Interstitial Perfusion Culture with Specific Soluble Factors Inhibits Type I Collagen Production from Human Osteoarthritic Chondrocytes in Clinical-Grade Collagen Sponges. *PloS One*. 2016;11(9):e0161479.
41. Terra Brito CL, Disant F. [The nasal framework in rhinoplasty and its dimensions: the importance of a third element]. *Rev Laryngol - Otol - Rhinol*. 2010;131(2):119-23.
42. Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, et al. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials*. June 2010;31(16):4506-16.

Annexes.

Liste des communications orales.

30 septembre 2021 :

Lauréate de l'Appel À Projet Innovant de la Fondation des Hospices Civils de Lyon.

Octobre 2021 :

Communication radiophonique sur la Radio lyonnaise RCF à la demande de la Fondation Hospices Civils de Lyon.

20 janvier 2022 :

Comité de Suivi de la Plateforme CoLab' HCL pour les projets soutenus par l'Appel À Projet Innovant Hospices Civils de Lyon.

16 septembre 2022 :

Congrès de l'ETRS (European Tissue Repair Society) Lyon.

Reconstruction of nasal cartilage with 3D impression and tissue engineering.

Vertu-Ciolino D, Padeloup M, Courtial EJ, Marquette C, Perrier-Groult E, Malcor J, Mallein-Gerin F.

13 octobre 2022 :

Comité de Suivi de la Plateforme CoLab' HCL pour les projets soutenus par l'Appel À Projet Innovant Hospices Civils de Lyon.

Publications.

- Article en cours de soumission au **Journal of Facial Plastic Surgery and Aesthetic Medicine.**

Challenges in nasal septum engineering to restore the shape and function of the nose

A review

Delphine Vertu-Ciolino, Edwin-Joffrey Courtial, Marielle Pasdeloup, Christophe Marquette, Emeline Perrier-Groult, Frédéric Mallein-Gerin, Jean-Daniel Malcor

- Article scientifique en préparation sur l'ensemble du travail de recherche.

Delphine VERTU-CIOLINO, Marielle PASDELOUP, Edwin-Joffrey COURTIAL, Emeline PERRIER-GROULT, Christophe MARQUETTE, Frédéric MALLEIN-GERIN, Jean-Daniel MALCOR.

Reconstruction du cartilage nasal par impression 3D et ingénierie tissulaire **le projet NASALTIS**

Le projet repose sur l'association de trois équipes qui ont mis en commun leur expertise pour permettre ce travail interdisciplinaire associant la biologie cellulaire, l'impression 3D, et des compétences chirurgicales. La chirurgie reconstructrice du nez se heurte souvent au manque de cartilage. Le cartilage de la cloison nasale est la pièce maîtresse du nez. Son rôle est à la fois morphologique pour donner la forme projetée spécifique du nez humain, et fonctionnel pour maintenir perméable les fosses nasales au moment de l'inspiration. Ainsi la cloison nasale a un rôle à la fois morphologique et fonctionnel majeur. Malheureusement, le nez est un organe exposé au traumatisme ou aux pertes de substance en cas d'exérèse de tumeur maligne. De plus, le cartilage est un tissu avasculaire, ce qui entraîne une absence de capacités de régénération. La reconstruction du nez doit donc faire appel à des greffons de cartilage autologue prélevés au niveau du cartilage de l'oreille ou du cartilage des côtes, au prix d'une morbidité du site donneur pour le patient. Des implants alloplastiques existent, mais présentent un risque très élevé de surinfection et de rejet. C'est pourquoi les chirurgiens se tournent aujourd'hui vers l'ingénierie tissulaire pour éviter ces écueils. Les propriétés mécaniques du cartilage sont très importantes et doivent être imitées par le tissu construit en ingénierie tissulaire. Nous avons imaginé un concept de prothèse de cloison nasale associant un support structurel fabriqué dans un matériau de grade médical, de structure poreuse, imprimable en 3D, recouvert d'un gel de fibrine chargé de chondrocytes nasaux humains, pour répondre aux enjeux mécaniques et améliorer l'immunotolérance du tissu construit. Les chondrocytes nasaux humains sont obtenus par dons de résidus opératoires auprès de patients ayant donné leur consentement. L'amplification des chondrocytes, puis leur culture en hydrogel de fibrine, ont été réalisées en utilisant des facteurs solubles chondrogéniques, selon un protocole qui avait déjà montré son efficacité sur des chondrocytes nasaux et articulaires, au contact de différents supports liquides ou solides. Deux matériaux-candidats ont été évalués, en testant leur imprimabilité, et leur biocompatibilité avec des chondrocytes nasaux en hydrogel de fibrine, après 3 semaines de culture *in vitro*, puis 6 semaines de culture *in vivo* sous la peau de la souris nude. Les essais d'imprimabilité, puis les analyses de la matrice extra cellulaire obtenue en PCR, en Western Blot réalisées après 3 semaines *in vitro* puis après 6 semaines *in vivo*, ont permis de retenir un silicone de grade médical. Le matériau sélectionné a ensuite été imprimé selon une forme inspirée des techniques chirurgicales actuelles. Ce support à taille réelle a subi des tests mécaniques pour atteindre un module d'Young proche du cartilage de la cloison native. Puis, il a été placé dans un moule et recouvert d'un gel de fibrine chargé de chondrocytes nasaux et cultivé pendant 3 semaines *in vitro*. La qualité de la matrice extracellulaire obtenue autour du support a été analysée par des tests d'immunofluorescence sur le collagène de type II. La manipulabilité de la prothèse de cloison nasale construite, et sa capacité à soutenir le dos du nez pour lui rendre sa forme et sa fonction, ont été testés par des essais sur cadavres, car il n'existe pas de modèle animal pour le nez humain. Notre étude a permis de sélectionner un matériau imprimable et biocompatible, puis de fabriquer une prothèse de cloison nasale humaine associant des chondrocytes nasaux humains.

Mots-Clés : Cartilage, Nez, Ingénierie tissulaire, Impression 3D, Mécanique, Biomatériau, Biocompatibilité.

Reconstruction of the cartilage of the nose with 3D printing and tissue engineering

Our project is based on the association of three teams that have pooled their expertise to enable this interdisciplinary work combining cell biology, 3D printing, and surgical skills. Reconstructive surgery of the nose is often hampered by a lack of cartilage. The cartilage of the nasal septum is the key element of the nose. Its role is both morphological to give the specific projected shape of the human nose, and functional to keep the nasal cavity permeable during inspiration. Thus the nasal septum has both a major morphological and functional role. Unfortunately, the nose is an organ exposed to trauma or loss of substance in the case of malignant tumor removal. Moreover, the cartilage is an avascular tissue, which results in a lack of regenerative capacity. Reconstruction of the nose must therefore use autologous cartilage grafts harvested from the ear or from the rib, with morbidity of the donor site for the patient. Alloplastic implants exist, but present a very high risk of superinfection and rejection. This is why surgeons are now turning to tissue engineering to avoid these pitfalls. The mechanical properties of cartilage are very important and must be mimicked by tissue engineered tissue. We imagined a concept of nasal septum prosthesis combining a structural support made of a medical grade material, with a porous structure, 3D printable, covered with a fibrin hydrogel loaded with human nasal chondrocytes, to meet the mechanical challenges and improve the immunotolerance of the constructed tissue. The human nasal chondrocytes are obtained by donation of surgical residues from patients who have given their consent. The amplification of the chondrocytes, then their culture in a fibrin hydrogel, was carried out using soluble chondrogenic factors, according to a protocol which had already shown its effectiveness on nasal and articular chondrocytes, in contact with various liquid or solid supports. Two candidate materials were evaluated, by testing their printability, and their biocompatibility with nasal chondrocytes in a fibrin hydrogel, after 3 weeks of *in vitro* culture, then 6 weeks of *in vivo* culture under the skin of nude mice. The printability tests, then the PCR and Western Blot analysis performed after 3 weeks *in vitro* and after 6 weeks *in vivo*, of the extracellular matrix of the tissue obtained, allowed us to retain a medical grade silicone. Then, the selected material was printed in a shape inspired by current surgical techniques. This full-size support underwent mechanical tests to reach a Young's modulus close to the native septum cartilage. Then, it was covered with a fibrin hydrogel loaded with nasal chondrocytes and cultured for 3 weeks *in vitro*. The quality of the extracellular matrix obtained around the support was analyzed by immunofluorescence tests on type II collagen. The manipulability of the constructed septum prosthesis, and its ability to support the dorsum of the nose to restore its shape and function, was tested by cadaveric testing, as there is no animal model for the human nose. At the end, we have been able to select a printable, biocompatible material and to manufacture a human septum prosthesis combining nasal human chondrocytes.

Keywords : Cartilage, Nose, Tissue engineering, 3D Printing, Mechanical strength, Biomaterial, Biocompatibility.

*Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique-UMR 5305
Équipe ROAD Recherche en Ostéo-Articulaire et Dentaire
Institut de Biochimie de Protéines
7 passage du Vercors - 69367 Lyon Cedex 07*

