

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
UMR 1109 « Nanomédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire »

THÈSE

Par : **Sandy Eap**

Soutenue publiquement le : **7 octobre 2014**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Science du Vivant/ Ingénierie Tissulaire

Développement d'implants nanofibreux actifs pour la régénération osseuse

Directeur de Thèse

Mme Nadia Benkirane-Jessel

Directeur de recherche, Inserm UMR 1109, Strasbourg

Rapporteurs Externes

M. Philippe Rosset

Professeur, Université de François-Rabelais, Tours

M. Xiong Wang

Professeur, LEMTA, Nancy

Rapporteur Interne

M. Henri Tenenbaum

Professeur, Université de Strasbourg

La violence est le dernier refuge de l'incompétence.

Isaac Asimov

知之为知之，不知为不知，是知也。

孔夫子 (Confucius)

À mes grands-parents, Pang Chí et Yín Chíhuon.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité de recherche Inserm UMR1109, « Nanomédecine Régénératrice Ostéoarticulaire et Dentaire ». Je tiens à remercier le Dr Nadia Jessel de m'avoir accueillie au sein de son unité et de la confiance qu'elle m'a accordée. J'aimerais également la remercier pour son aide, son encadrement, sa disponibilité, et ses conseils durant ces années de thèse sous sa direction.

Je tiens à adresser mes remerciements et ma reconnaissance aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail :

Pr Philippe Rosset, Pr Xiong Wang, et Pr Henri Tenenbaum pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteurs.

Pr Jean-François Stoltz, Pr Didier Mainard, et Pr Guy Schlatter pour avoir accepté de participer à mon jury en tant qu'invité.

Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ces travaux.

Je souhaiterais remercier l'Institut de Chimie et Procédés pour l'Énergie, l'Environnement et la Santé (ICPEES) et le Pr Guy Schlatter de m'avoir accueillie occasionnellement pour mes travaux de recherche.

Je remercie M. Manuel Arruebo et M. Victor Sebastian ainsi que les personnes de leur équipe pour leur aide.

Je voudrais également remercier Mme Nadia Messaddeq, M. Jean-Luc Weickert, M. Léandro Jacomine, M. Guy Ladam et M. Lionel Thomas pour leur travail et leur expertise qui m'ont beaucoup aidée dans mon travail.

Je remercie également les personnes que j'ai côtoyées durant ma thèse pour le temps passé en leur compagnie :

Alice, merci pour ton aide et tes conseils en electrospinning.

Laetitia, merci pour tes conseils, ta patience, ton aide, ça été un plaisir de travailler avec toi.

Tunay, merci pour ta bonne humeur et tes remarques qui nous ont toujours fait rire.

David, merci pour les discussions philosophiques et sessions de chants improvisés au labo.

Stéphanie, merci pour tes conseils de dentiste et les bons moments passés ensemble.

Sabine, merci pour ton enseignement en expérimentation animale et ton aide précieuse.

Carlos, Jessica, Valérie, Anne-Laure, M. Lesot, merci pour votre aide et vos conseils.

M. Fluck, merci pour votre bonne humeur et votre aide de bricoleur

Arielle, merci pour ta patience, ta présence et ton génie des commandes.

Hervé, merci pour ton travail et ton aide précieuse en histologie.

Florence, merci pour ton aide en chirurgie et ta gentillesse.

Olivier, merci pour les macarons et pour ta bonne humeur.

M.Davideau, René, François, ça été un plaisir de vous côtoyer.

Je n'oublie évidemment pas les stagiaires qui m'ont aidée durant ce travail :

Miriam et Julia, merci pour votre travail et votre sérieux.

Pierre, merci pour tes pâtisseries, ta gentillesse, et les échanges culinaires.

Yacine, merci pour ta bonne humeur et tes biscuits.

Célia, merci pour les cookies.

Je remercie également Salima pour sa bonne humeur et sa présence.

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais enfin remercier tous mes proches qui de près ou de loin ont contribué à me faire grandir et évoluer et qui m'ont conduit là où je suis aujourd'hui.

Je voudrais remercier tout particulièrement Thibault, mon compagnon de toujours, tu m'as toujours soutenue et encouragée dans tout ce que j'entreprenais quelque soit la distance et la difficulté. Tu étais présent dans les très bons et les très mauvais moments et grâce à toi, tout est toujours plus facile. Pour tout ça, je te remercie du fond du cœur.

Merci à ma mère pour tout, je ne pense pas pouvoir faire une liste de tout ce que tu m'as apporté et appris.

Merci à Lasoeur pour tes encouragements, ton soutien et ta présence dans les moments qui comptent.

Je souhaiterais également remercier M.Bécavin pour son soutien et son aide : merci d'avoir fait l'effort, ton aide a été très précieuse.

Je remercie Monika et Alyssa pour tous les bons moments passés ensemble, votre présence et votre soutien m'ont été très précieux.

Merci à mon père.

Merci à ma très grande famille pour leur soutien et leurs encouragements.

Je remercie également Hannes pour ses chocolats et sa gentillesse.

Merci à Paul pour ses encouragements, sa générosité et sa gentillesse.

Je remercie également tous mes amis pour leur amitié et leur soutien durant toutes ces années:

D'enfance : Julie, nous sommes amies depuis plus de 20 ans et j'espère que nous le resterons encore longtemps.

De lycée : Hélène, Charlotte, Julie, Jennifer, Pauline, merci pour les fous rires et les bons moments.

De prépa : Yolande, Alexandre, Julien, Sylvain, Cédric, malgré la distance, vous êtes et resterez mes compagnons de galère.

D'école d'ingé : Rama, Valérie, Adrien, Clémence, Pierre, votre amitié a permis de rendre plus belles ces années passées à Roubaix.

Table des matières

Liste des abbréviations	9
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
I. LES PATHOLOGIES OSSEUSES, UN PROBLÈME DE SANTÉ PUBLIQUE	19
1. Généralités	21
1.1. Le tissu osseux.....	21
1.1.1. La matrice extracellulaire (MEC)	22
1.1.2. Les cellules osseuses.....	24
1.1.3. Le remodelage osseux.....	26
1.2. La régénération osseuse et les biomatériaux synthétiques	28
1.2.1. La médecine régénérative osseuse	28
1.2.2. Les polymères biodégradables : avenir de la régénération osseuse	31
1.3. Les biomatériaux	34
1.3.1. Biomatériaux inertes et techniques de mise en oeuvre	34
1.3.2. Biomatériaux actifs et facteurs de croissance	39
1.3.3. Les biomatériaux vivants et thérapie cellulaire	46
2. Pathologies osseuses en Orthopédie : application 1	50
2.1. Pathologies osseuses	50
2.1.1. Ostéoporose.....	50
2.1.2. Fractures.....	52
2.2. Pseudarthrose ou fracture non-consolidée.....	54
2.3. Les traitements actuels.....	56
2.4. Les traitements prometteurs	58

3. Pathologies osseuses en Chirurgie Maxillo-Faciale et en Parodontologie :

applications 2	61
3.1. Pertes osseuses	61
3.1.1. Pertes osseuses en chirurgie maxillo-faciale.....	61
3.1.2. Cas particulier des maladies parodontales	65
3.2. Régénération tissulaire ou osseuse guidée.....	69
3.3. Traitements actuels	72
3.3.1. Membranes non-résorbables	72
3.3.2. Membranes résorbables d'origine animale	72
3.4. Traitements prometteurs : les polymères synthétiques actifs, une nouvelle alternative	74

II. OBJECTIFS DE LA THÈSE 80**III. MATÉRIEL ET MÉTHODES 84****1. Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation des biomatériaux..... 85**

1.1. Mise en œuvre des biomatériaux par electrospinning	85
1.1.1. Fabrication des membranes fines.....	85
1.1.2. Mise en œuvre des implants 3D épais.....	87
1.2. Fonctionnalisation des biomatériaux.....	88
1.2.1. Préparation des solutions	88
1.2.2. Fonctionnalisation des membranes par dépôt de multicouches de polyélectrolytes... 89	
1.3. Observation et caractérisation des membranes au microscope électronique à balayage.....	91

2. Caractérisation *in vitro* des implants nanofibreux 93

2.1. Culture cellulaire.....	93
2.1.1. Milieux et types cellulaires	93
2.1.2. Culture cellulaire d'ostéoblastes et de CSMs humains.....	94
2.2. Observation du comportement cellulaire au MEB	95
2.3. Suivi de l'évolution de la prolifération et de l'activité cellulaire	96
2.4. Observation de l'expression des protéines osseuses	98

2.5.	Observation de la minéralisation osseuse.....	99
2.5.1.	Test du xylénol orange.....	99
2.5.2.	Coloration au rouge d'Alizarine	100
2.5.3.	Analyse au Raman confocal.....	101
3.	Caractérisation <i>in vivo</i> des implants nanofibreux.....	103
3.1.	Préparation des échantillons	103
3.1.1.	Préparation des membranes fines.....	103
3.1.2.	Préparation des implants 3D	104
3.2.	Expérimentation animale chez le modèle murin	104
3.2.1.	Implantations sous-cutanées chez la souris Nude.....	105
3.2.2.	Implantations en calvaria chez les souris Nude, ICR et GFP	106
3.2.3.	Explantation des échantillons	109
3.3.	Observation de l'expression des protéines osseuses après implantation.....	111
3.4.	Observation histologique de synthèse matricielle <i>in vivo</i>	112
3.5.	Analyse de la minéralisation <i>in vivo</i>	112
3.5.1.	Analyse par Raman confocal	112
3.5.2.	Imagerie par MEB-spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie.....	113
3.6.	Observation du remodelage osseux	114
3.6.1.	Injection pré-explantatoire de la calcéine	114
3.6.2.	Traitement post-explantatoire	115
3.7.	Mesure des propriétés mécaniques.....	116
IV.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	117
Chapitre 1 :	Implants de collagène équipés de nanoréservoirs actifs pour la	
	régénération osseuse	118
1.1.	Contexte et objectifs.....	119
1.2.	Résultats et discussion.....	120
1.3.	Conclusion.....	121
Chapitre 2 :	Propriétés ostéogéniques d'une membrane fine nanofibreuse de PCL	
	fonctionnalisée par des nanoréservoirs actifs.....	122

2.1.	Contexte et objectifs	123
2.2.	Résultats et discussion.....	124
2.2.1.	Influence de la nature des polyélectrolytes sur les nanoréservoirs	124
2.2.2.	Propriétés ostéogéniques des nanoréservoirs	126
2.3.	Conclusion.....	127

<u>Chapitre 3 : Développement d'un implant nanofibreux 3D épais pour la</u>		
	régénération osseuse	129
3.1.	Contexte et objectifs	130
3.2.	Résultats et discussion.....	130
3.2.1.	Optimisation du procédé et production des implants 3D.....	130
3.2.2.	Potentiel des implants 3D: régénération osseuse	132
3.3.	Conclusion.....	134

<u>Chapitre 4 : Double fonctionnalisation d'implants 3D par des nanoréservoirs</u>		
	actifs et des cellules pour la médecine régénérative osseuse	135
4.1.	Contexte et objectifs	136
4.2.	Résultats et discussion.....	137
4.2.1.	Effet de la double fonctionnalisation des implants 3D sur la régénération osseuse .	137
4.2.2.	Les sources alternatives de cellules souches.....	139
4.3.	Conclusion.....	141

V. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	142
--	------------

VI. ANNEXES	146
--------------------------	------------

Annexe 1	147
-----------------------	------------

Annexe 2	148
-----------------------	------------

VII. RÉFÉRENCES.....	149
-----------------------------	------------

Liste des abbréviations

Alg	alginate
ARNm	acide ribonucléique messenger
BMP	protéine morphogénique osseuse (bone morphogenetic protein en anglais)
BSA	albumine de sérum bovin (bovin serum albumin en anglais)
BSPII	sialoprotéine osseuse 2 (bone sialoprotein 2 en anglais)
CHI	chitosane
CSMs	cellules souches mésenchymateuses
d	densité
D	facteur de dissipation
DA	degré d'acétylation
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCM	dichlorométhane
DGL-G5	dendrigraft de lysine de génération 5
DMEM	milieu Eagle modifié de Dubelcco (dubelcco's modified eagle medium en anglais)
DMF	diméthylformamide
E	Module d'élasticité ou module d'Young
CSEs	Cellules souches embryonnaires
EtOH	éthanol
FDA	US Food and Drug Administration en anglais
G	gauge
GAG	glycosaminoglycane
GFP	green fluorescent protein en anglais
HA	acide hyaluronique
HCl	acide chlorydrique

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

HMDS	hexaméthylidisilazane
Hob	ostéoblaste humain primaire
ICR	Imprinting Control Region en anglais
m	masse
MEB	microscopie électronique à balayage
MEC	matrice extracellulaire
MEM	Milieu minimum essentiel (minimum essential medium en anglais)
MES	acide 2-morpholino éthanesulfonique
NaCl	chlorure de sodium
NK	natural killer en anglais
HA	acide hyaluronique (hyaluronic acid en anglais)
HAp	hydroxyapatite
OCN	ostéocalcine
OPN	ostéopontine
PAA	acide polyacrylique
PAH	poly(hydrochlorure d'allylamine)
PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffered saline en anglais)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDLLA	acide poly(D,L-lactique)
PDMS	polydiméthylsiloxane
PE	polyéthylène
PEG	poly(éthylène glycol)
PEI	poly(éthylèneimine)
PET	polyéthylène téréphtalate
PFA	paraformaldéhyde
PGA	acide polyglycolique

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

P/GA	acide poly(<i>l</i> -glutamique)
PLL	poly(L-lysine)
PLLA	acide poly(L-lactique)
PMMA	polymétacrylate de méthyle
PSM	poste de sécurité microbiologique
PSS	poly(styrène sulfonate)
QCM	microbalance à cristal de quartz
QCM-D	microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation
q-PCR	réaction en chaîne par polymérase quantitative
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique
rhBMP-2 ou rhBMP-7	protéine morphogénique osseuse recombinante humaine 2 ou protéine morphogénétique osseuse recombinante humaine 7 (recombinant human bone morphogenetic protein en anglais)
TGF- β	facteur de croissance de transformation β (transforming growth factor β en anglais)
α -MSH	α -mélanocortine

Liste des figures

Figure 1: Structure des tissus osseux compact et spongieux.....	22
Figure 2: Observation des striations des fibres de collagène au microscope à faisceau d'ion d'hélium (HIM)	23
Figure 3: Ostéoblastes, osteocytes, et ostéoclastes schématisés et observés au MEB	25
Figure 4: Schéma du cycle du remodelage osseux.....	28
Figure 5: Observation au MEB de membranes de PCL préparées par l'iviation de porogène de différentes tailles de granulation.....	35
Figure 6: Schéma du montage de l'électrospinning	37
Figure 7: Influence de l'enchevêtrement des chaînes de polymère sur la morphologie des fibres électrospinnées. Observation au MEB à partir d'une membrane électrospinnée de PCL.	38
Figure 8: Mesure du module d'élasticité par nanoindentation de membranes composites.....	41
Figure 9: Construction d'un film multicouche de polyélectrolyte (LBL) par trempages successifs alternés de polyanion (bleu) et de polycation (rouge).	45
Figure 10 : Comparaison d'un os trabéculaire sain et d'un os trabéculaire ostéoporeux au MEB	51
Figure 11: Processus de consolidation d'une fracture osseuse.	54
Figure 12: BioVERSE™ éponge de collagène allogénique commercialisée par Stryker/Olympus Biotech	56
Figure 13: OP-1® Putty et OP-1® Implant commercialisés par Stryker/Olympus Biotech....	57
Figure 14: Schéma explicatif de l'organe dentaire et du parodonte.....	66
Figure 15: Procédure d'élévation du sinus maxillaire.....	71
Figure 16: Observation au MEB de la membrane Bio-Gide®	73
Figure 17: Structure chimique de la PLL et du chitosane	78
Figure 18: Appareillage standard Electrospinning Apparatus EC-DIG fourni par IME Technologies	86
Figure 19: Implants 3D après electrospinning	88
Figure 20: Image macroscopique de membranes fines de PCL électrospinnées dans une plaque de 24 puits avec un montage sur insert	90
Figure 21: Métalliseur Cressington 108auto/SE muni de sa pompe Duo Line	91
Figure 22: Implantation des membranes fines en sous-cutané chez la souris Nude	106

Figure 23: Micromoteur SUNI™ et trépan osseux et contre-angle adaptés.	107
Figure 24: Lésion de petite taille comblée par un implant 3D en calvaria chez la souris ICR	108
Figure 25: Lésion de grande taille recouverte par un implant 3D en calvaria chez la souris ICR.....	109
Figure 26: Images de l'implant 3D après 4 semaines d'implantation en calvaria chez une souris Nude	110

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure chimique et temps de dégradation de différents polyesters.....	32
Tableau 2 : Polymères et solvants utilisés dans le procédé d'electrospinning	85
Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence	98
Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires correspondant aux anticorps primaires utilisés en immunofluorescence	98

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Avec des recherches toujours plus poussées ayant pour but d'améliorer la santé et de guérir le plus grand nombre de personnes, la médecine régénérative et plus particulièrement l'ingénierie tissulaire sont deux grandes voies visant le développement pour les technologies appliquées à la santé. La médecine régénérative est une stratégie thérapeutique encore en cours de développement, visant à réparer une lésion ou un organe malade grâce à des cellules souches qui vont se différencier pour remplacer les tissus lésés ou malades.

Les pathologies osseuses sont aujourd'hui un réel problème de santé public. L'ingénierie tissulaire a été développée dans le but de régénérer partiellement ou complètement des tissus ou des organes abîmés du corps humain en implantant un tissu ou un organe de remplacement au niveau des tissus endommagés. Il était par conséquent nécessaire de développer en premier lieu des matériaux biocompatibles, c'est-à-dire devant être acceptés par l'organisme, non toxiques et ne provoquant aucune réaction inflammatoire ou allergique. Ces matériaux biocompatibles devaient ensuite être capables d'interagir avec les cellules du patient au site de l'implantation du matériau afin d'en aider sa fonction. La nécessité de développer des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire devenait alors une évidence.

En 1986, la conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux a permis de clairement définir la notion de biomatériau en terme de « matériaux non vivants, utilisés dans un appareil médical et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'un organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle ».

Après la première génération des biomatériaux inertes, la recherche s'est ensuite intéressée aux matériaux bioactifs engendrant une réponse spécifique à l'interface matériau/tissu et intégrant parfaitement le matériau au tissu nouvellement formé (Cao and Hench, 1996). Enfin, une nouvelle génération de biomatériaux a été développée en vue des besoins croissants de la population vieillissante, du manque de donneurs, et de la quantité insuffisante de tissus autologues. Ces nouveaux matériaux bioactifs et biodégradables offrent la possibilité de non seulement remplacer le tissu endommagé mais aussi de l'aider à se régénérer dans son intégralité, c'est ainsi que le concept de médecine régénérative s'est développé. En 2005, Mac Arthur et Oreffo ont étendu ce concept au développement de technologies pouvant se baser sur des données acquises de la science sur les mécanismes

physiologiques régissant la vie des tissus dans le but d'améliorer les stratégies thérapeutiques (MacArthur and Oreffo, 2005).

La recherche en ingénierie tissulaire et en médecine régénérative a pour ambition finale de synthétiser et/ou de régénérer tout type de tissus humains ou organes entiers tels que la peau, les vaisseaux sanguins, le cartilage, les nerfs, les os, etc. Il s'agit de développer un biomatériau tridimensionnel organisé fonctionnalisé par des molécules actives et des cellules afin de permettre de moduler et de contrôler la réponse biologique de l'organisme et d'induire une régénération tissulaire.

Notre projet, quant à lui, s'intéresse principalement au domaine de la régénération osseuse. En effet, les os remplissent une fonction de soutien dans l'organisme : le tissu osseux participe à de nombreuses fonctions telles que les fonctions mécaniques, protectrices, ou encore métaboliques. Cependant, le tissu osseux, comme tous les tissus du corps humain, peut être endommagé par des maladies ou des blessures. Ainsi, lorsque la taille des défauts osseux est telle que l'os est incapable de se régénérer, l'utilisation de substituts osseux est alors nécessaire afin d'aider l'organisme à la régénération. L'approche la plus courante en ingénierie tissulaire est aujourd'hui une approche biomimétique basée sur l'utilisation de biomatériaux mimant la matrice extracellulaire des cellules composant les tissus et s'appuyant sur le modèle du corps humain. L'implantation de ces biomatériaux (sous forme de membrane par exemple) dans l'organisme induira la régénération des tissus *in vivo*. La recherche tend à mimer au mieux l'environnement biologique naturel au sein duquel le biomatériau sera par la suite implanté afin d'optimiser les conditions de régénération tissulaire. Le choix du matériau à implanter quant à ses propriétés physico-chimiques, de biocompatibilité, et de biodégradabilité est donc critique. Pour cela, de nombreuses techniques d'élaboration de biomatériaux visant l'imitation de la matrice extracellulaire ont été développées (Langer and Tirrell, 2004; Lee et al., 2008 ; Dvir et al., 2011). La technique de l'électrofilage, ou plus communément appelée *electrospinning*, permet notamment la mise en œuvre de biomatériau nanofibreux, microporeux mimant de manière semblable la structure de la matrice extracellulaire. Enfin, différentes méthodes ont été développées afin de fournir à ces biomatériaux des propriétés complémentaires leur permettant d'interagir avec le tissu vivant et aider à la régénération.

Notre projet se positionne comme les prémices d'une solution technologique ayant pour but la régénération osseuse. L'objectif de notre travail vise le développement d'un

implant synthétique 3D bioactif utilisable à l'avenir en clinique pour des applications orthopédiques ou maxillo-faciales en médecine régénérative. Notre objectif essentiel étant de développer des implants thérapeutiques actifs pour la régénération osseuse, nous avons, dans un premier temps, développé une stratégie de fonctionnalisation basée sur des nanoréservoirs actifs capables d'améliorer les propriétés ostéogéniques de membranes déjà commercialisées et utilisées en clinique (**Chapitre 1**). Après la validation de notre stratégie de fonctionnalisation, nous nous sommes concentrés sur le développement d'une membrane synthétique nanofibreuse par électrospinning. Cette membrane sera désignée sous l'appellation « membrane fine ». L'élaboration de ces membranes électrospinnées associée à notre stratégie de fonctionnalisation a conduit au développement d'une membrane synthétique nanofibreuse microporeuse et bioactive (**Chapitre 2**). Cette membrane possède des propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices améliorées mais présente l'inconvénient d'une finesse non adaptée à une taille de lésion osseuse plus importante.

Afin de pouvoir élargir le champ d'application de notre technologie en terme de taille de lésion osseuse, nous nous sommes ensuite focalisés sur l'optimisation de la technique d'électrospinning pour développer un implant synthétique épais 3D nanofibreux (**Chapitre 3**). Par la suite, nous désignerons cet implant, « implant 3D » par opposition aux « membranes fines ». Nous avons caractérisé cet implant 3D par des analyses *in vitro* et *in vivo*, vérifiant sa capacité à induire une régénération osseuse effective malgré une épaisseur bien supérieure à celle des membranes fines.

Enfin, nous avons combiné notre stratégie de fonctionnalisation et l'utilisation de cellules souches mésenchymateuse au sein de nos implants 3D afin de les rendre bioactifs et vivants (**Chapitre 4**). Nous avons ainsi permis l'amélioration des performances de notre implant 3D en terme de vitesse de régénération osseuse.

I. LES PATHOLOGIES OSSEUSES, UN PROBLÈME DE SANTÉ PUBLIQUE

Les maladies et traumatismes osseux sont très nombreux et posent depuis de nombreuses années un problème de santé publique. Les conséquences des pathologies de l'appareil locomoteur sont liées à leur impact sur les systèmes de santé en terme de coûts directs et indirects. Le vieillissement de la population est un des facteurs responsable du problème grandissant de ce genre de maladies. Elles entraînent souvent le recours à une assistance permanente ou temporaire et l'aide d'une tierce personne. De nombreuses études font état de l'épidémiologie de pathologies osseuses spécifiques dans différents pays, ainsi les chiffres sont méconnus en terme d'impact global. Toutefois, certaines données chiffrées ressortent, plus de 2 millions de greffes osseuses ont lieu annuellement dont 500 000 sont effectuées aux USA (Giannoudis et al., 2005; HAS, 2013). En France, sur la période de 2010-2011, plus de 80 000 substituts osseux ont été facturés, tous secteurs confondus, pour un montant total de près de 20 millions d'euros. En se restreignant au secteur publique, le nombre d'hospitalisations comportant l'utilisation de substituts osseux pour la période de 2010-2011 s'élève à presque 27 000. Parmi ces nombreux cas, 53,9 % sont dus à des maladies ostéo-articulaires, 34,3 % à des traumatismes osseux tels que les fractures et 1,6 % à des cancers osseux (HAS, 2013). Cependant, ces chiffres ne concernent que les hospitalisations ayant nécessité un substitut osseux, les hospitalisations et les coûts pour des pathologies osseuses n'ayant pas nécessité de substituts ne sont pas pris en compte. Pour exemple, en France, le nombre annuel de fractures dues à l'ostéoporose seule s'élève à plus de 20 000 hospitalisations.

Les données de la littérature montrent également que plusieurs spécialités sont concernées comme par exemple, la chirurgie orthopédique, la neurochirurgie, la chirurgie dentaire, la chirurgie maxillo-faciale, la chirurgie ORL et cervicale.(HAS, 2013)

Notre intérêt se portera uniquement sur les domaines de la chirurgie orthopédique, dentaire et maxillo-faciale, domaines principalement visés par la technologie développée dans notre laboratoire.

Dans cette partie, nous allons décrire tout d'abord le tissu osseux, les mécanismes liés à son remodelage ainsi que les généralités sur les biomatériaux et la régénération osseuse. Nous ciblerons ensuite les pathologies osseuses en orthopédie, mais également les pathologies rencontrées en chirurgie maxillo-faciale et le cas particulier des maladies parodontales. Les solutions existant aujourd'hui en clinique pour le traitement de telles pathologies seront présentées et les pistes de recherches applicables en clinique seront également envisagées.

1. Généralités

1.1. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé vascularisé et innervé possédant une structure hiérarchique ainsi qu'une composition particulière qui lui confèrent une rigidité et une résistance adaptées à son rôle prépondérant dans le corps. Il assure quatre fonctions majeures : (1) une **fonction biomécanique** grâce à son positionnement anatomique, le tissu osseux assure la station debout et la locomotion, il sert de points d'ancrage des muscles squelettiques et des tendons ; (2) une **fonction protectrice**, grâce à sa dureté et à sa résistance, il protège les organes vitaux tels que le système nerveux central grâce à la boîte crânienne ou encore le cœur et les poumons grâce à la cage thoracique ; (3) une **fonction métabolique** car il est la principale réserve d'ions minéraux de l'organisme, le tissu osseux est un acteur majeur de l'homéostasie phosphocalcique ; (4) enfin, il joue également un rôle prépondérant dans le **contrôle de l'hématopoïèse** qui est le processus physiologique permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines ou hématocytes.

Les os constituant le squelette sont de plusieurs types: on distingue les os longs, les os courts et enfin les os plats. Les os longs sont composés d'une partie centrale, la diaphyse, et de deux extrémités, les épiphyses. Tous les os du squelette adulte sont constitués de deux types de tissus osseux présentant des architectures différentes : le **tissu osseux compact** ou **Haversien** (également appelé **os cortical**) et le **tissu osseux spongieux** (également appelé **os trabéculaire**) (**Figure 1**).

L'os compact constitue la partie périphérique des os, il est formé d'**ostéons** (**Figure 1**), aussi appelé système de Havers. Ces ostéons sont des unités osseuses cylindriques dont le diamètre est compris entre 0,1 et 1 mm et présentant une longueur maximale de 1 cm. Au centre de ces unités osseuses se trouve le **canal de Havers**, c'est un canal neuro-vasculaire autour duquel les lamelles concentriques minéralisées constituant le tissu osseux sont disposées. Les canaux de Volkmann traversent les ostéons de façon transversale et les relient.

L'os spongieux, quant à lui, possède une **architecture alvéolaire** comparable à celle d'une éponge (**Figure 1**). Il constitue l'intérieur des épiphyses des os longs et la partie centrale des os courts et plats.

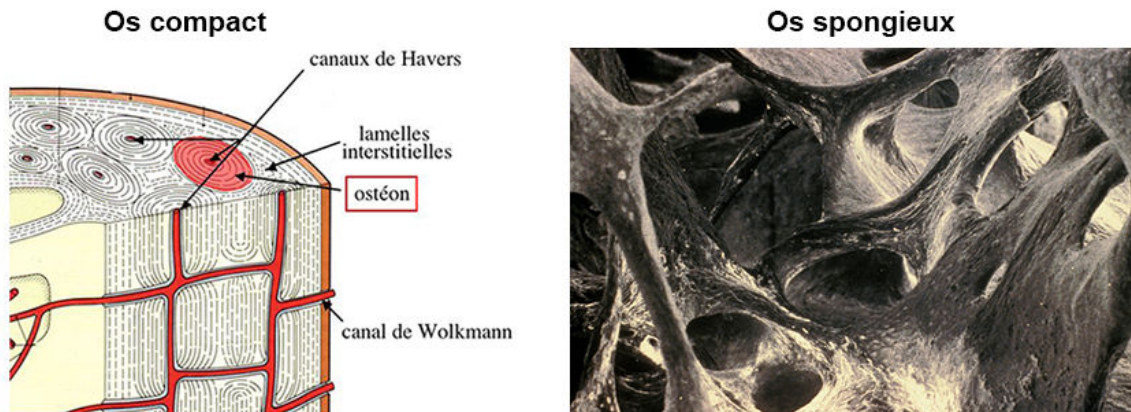


Figure 1: Structure des tissus osseux compact et spongieux (Boivin, 1988; Nataf, 2009)

1.1.1. La matrice extracellulaire (MEC)

Comme tout tissu conjonctif, le tissu osseux est composé de **cellules** et d'une **matrice extracellulaire**. Mais l'os est un tissu conjonctif spécialisé car cette matrice est imprégnée de sels de calcium et de phosphate sous forme de cristaux grâce à un processus appelé **minéralisation**. Ainsi, le tissu osseux présente une constitution unique au sein de l'organisme car il possède une structure nanocomposite composée d'eau (9%) d'une **partie inorganique** minéralisée (phase minérale 69%), et d'une **phase organique** (22%), qui est produite par des cellules osseuses, les ostéoblastes. Cette structure particulière confère au tissu osseux des propriétés mécaniques uniques au sein de l'organisme : une **dureté** liée aux cristaux de la phase minérale, et une **flexibilité** donnée par l'eau et la matrice organique.

➤ *La matrice organique*

Elle est constituée principalement de fibres de **collagène de type I** (95%) entrecroisées formant un réseau complexe favorisant l'adhésion et la prolifération cellulaire. Ce collagène est dit fibrillaire, il possède des triples hélices serrées et sans interruption permettant l'association en fibrilles. La propriété essentielle des collagènes fibrillaires étant leur résistance à la traction, ils

confèrent aux tissus mous leur **résistance mécanique**. Les fibrilles de collagène présentent une striation caractéristique à leur surface (**Figure 2**), et leur diamètre varie entre 30 nm et 150 nm. Les fibrilles associées ensemble forment des fibres enchevêtrées d'environ 700 nm de diamètre et constituent l'**environnement biologique** nécessaire au bon développement du tissu. Ce réseau fibreux permet la fixation de l'**hydroxyapatite** et la minéralisation du tissu (Macé, 2008).

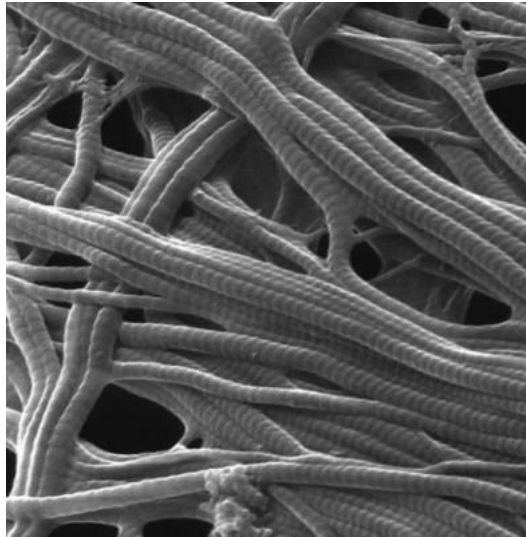


Figure 2: Observation des striations des fibres de collagène au microscope à faisceau d'ion d'hélium (HIM) (Zeiss, 2010)

Au collagène de type I, viennent s'ajouter d'autres types de collagène, et plus de deux cent autres protéines synthétisées par les cellules osseuses elles-mêmes. Parmi ces protéines, on retrouve des facteurs de croissance tels que le **TGFβ** (Transforming Growth Factor) ou les **BMPs** (Bone Morphogenetic Proteins), et également différentes glycoprotéines structurales non collagéniques. On peut ainsi citer les **protéoglycanes**, protéines très hydrophiles grâce à leur structure particulière dite en « peigne ». Cette structure est constituée de nombreux glycosaminoglycanes (GAGs) liés à un axe protéique principal. Grâce à leur propriété de rétention d'eau, les protéoglycanes forment des gels hydratés permettant le passage des éléments nécessaires entre le sang et les cellules du tissu osseux. Ils confèrent également au tissu osseux ses **propriétés viscoélastiques**.

D'autres protéines telles que l'**ostéocalcine**, l'**ostéonectine** ou encore les **sialoprotéines** (l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse 2 ou BSP2) peuvent également être mentionnées. L'**ostéocalcine** est essentiellement synthétisée par les ostéoblastes, c'est un marqueur spécifique

de ces cellules (McKee et al., 1992). Elle possède une affinité avec l'hydroxyapatite et participe au remodelage osseux en activant les ostéoblastes (Ducy et al., 1996). L'**ostéonectine** est la protéine non collagénique majoritaire dans l'os. Elle sert de point d'ancrage aux cristaux d'hydroxyapatite lors de la minéralisation en se liant fortement au collagène et aux cristaux (Young et al., 1992 ; Maurer et al., 1996). L'**ostéopontine (BSP1)** participe à la résorption osseuse en permettant aux ostéoclastes d'adhérer à la matrice (Denhardt and Guo, 1993). Enfin, la **sialoprotéine osseuse 2 (BSP2)** est plus spécifique que la BSP1 et régule la fixation des ostéoblastes à la matrice extracellulaire par les intégrines.

➤ *La phase minérale*

La phase minérale permet la **rigidité** et la **dureté** de l'os. Elle est constituée de sels minéraux dont le **calcium** et le **phosphate** sont les plus abondants. Elle est formée de **nanocristaux d'hydroxyapatite** dont la formule générale est: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ces cristaux en forme de plaques hexagonales sont associés en lamelles sur lesquelles se répartissent les ions calcium, phosphate et hydroxyle.

1.1.2. Les cellules osseuses

Trois catégories de cellules sont directement impliquées dans la biologie du tissu osseux (formation, dégradation, remodelage) (Macé, 2008) (**Figure 3**). Les **ostéoblastes** (**Figure 3 A, D**) sont responsables de la formation de la matrice organique non minéralisée précédemment mentionnée et appelée **ostéoïde** (Mackie, 2003). Les ostéoblastes déposent l'ostéoïde le long de l'interface entre des ostéoblastes eux-mêmes et l'os déjà formé. Leur membrane plasmique est riche en **phosphatase alcaline**. Cette enzyme peut être dosée et peut être considérée comme un index de la formation osseuse. Leurs produits spécifiques sont le collagène de type I, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse 2. Ils produisent également des facteurs de croissance, en particulier des membres de la famille des BMPs induisant l'ostéogenèse. Les ostéoblastes participent également au processus de **résorption osseuse en régulant l'activité des ostéoclastes**. Une catégorie particulière des ostéoblastes est à mentionner : ce sont les **cellules bordantes**. Ces cellules correspondent à des ostéoblastes très allongés et aplatis qui n'ont plus d'activité métabolique, ce sont des **ostéoblastes au repos**. Les

cellules bordantes recouvrent les surfaces osseuses dites inactives et sont unies entre elles et aux ostéocytes par des jonctions communicantes. Elles constituent une **barrière fonctionnelle** entre l'os minéralisé et la moelle osseuse. Elles n'ont pas d'activité de synthèse mais peuvent redevenir des ostéoblastes actifs si elles sont stimulées. Au fur et à mesure de la synthèse et de la minéralisation de la matrice, l'activité des ostéoblastes diminue et ils peuvent se transformer soit en ostéocytes soit en cellules bordantes ou mourir par apoptose.

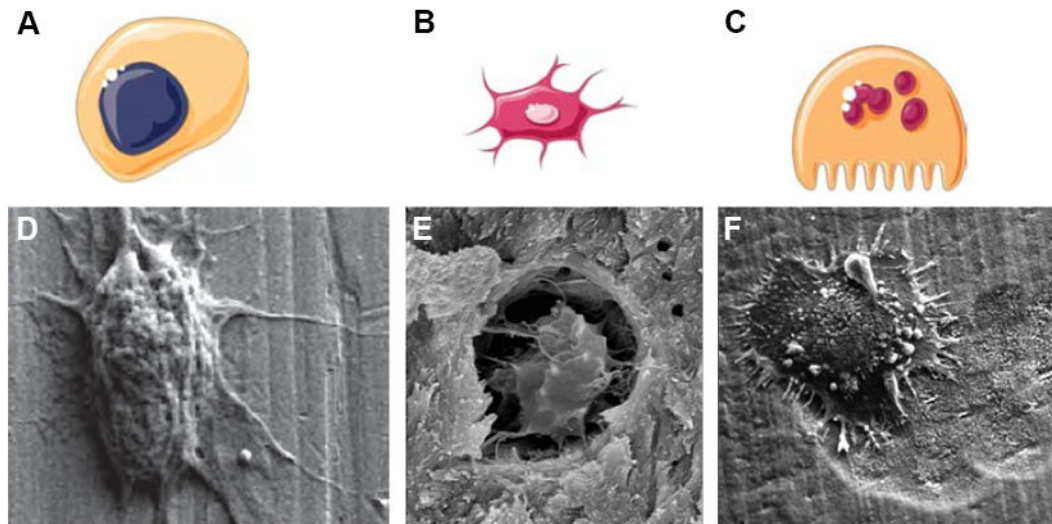


Figure 3: (A, D) Ostéoblastes, (B, E) osteocytes, et (C, F) ostéoclastes schématisés et observés au MEB (Depalle, 2011)

Les **ostéocytes** (Figure 3 B, E) sont issus de la **différenciation terminale** des ostéoblastes, ils sont enfermés dans la matrice organique minéralisée, dans des logettes appelées **ostéoplastes**. Ces cellules assurent le maintien de la MEC et participent à l'homéostasie de la calcémie (Skerry et al., 1989). Les ostéocytes restent en contact avec les ostéoblastes en surface grâce à l'établissement d'un système de **jonctions communicantes** qui sont des prolongements cytoplasmiques traversant la MEC minéralisée. Ces mêmes prolongements permettent aux ostéocytes d'être reliés entre eux et approvisionnés en nutriments grâce à des contacts avec des vaisseaux sanguins intra-osseux.

Enfin, les **ostéoclastes** (Figure 3 C, F) sont des cellules de grande taille (de 50µm à 100µm de diamètre), multi-nuclées, possédant de 10 à 20 noyaux, et observables dans les zones de dégradation du tissu osseux. Leur durée de vie moyenne est de deux semaines, par la suite les ostéoclastes entrent en apoptose. Ils sont responsables de la **dégradation de la matrice**

minéralisée par un mécanisme appelé **résorption osseuse** (Baron, 1995). Pour cela, ils génèrent un environnement acide, clos afin de dissoudre les composants inorganiques de l'os (**déminéralisation osseuse**). Ensuite, grâce à des **enzymes protéolytiques**, ils dégradent la composante organique de la MEC formant des lacunes de résorption osseuse : les **lacunes de Howship**. Les ostéoclastes sont des cellules mobiles, capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. Acteurs principaux de la résorption osseuse, ils jouent un rôle essentiel dans le remodelage et la formation de l'os.

1.1.3. Le remodelage osseux

L'os est un tissu qui se renouvelle durant toute la vie. Ce perpétuel remaniement (**Figure 4**) a pour but premier de **préserver les propriétés biomécaniques** du tissu osseux, son deuxième rôle est de **réguler l'homéostasie du calcium**. Le remodelage osseux se déroule en plusieurs étapes et résulte de l'action conjointe des ostéoblastes et des ostéoclastes. Les ostéoclastes résorbent l'os ancien alors que les ostéoblastes synthétisent et forment le nouveau tissu osseux. Chez l'adulte, un cycle de remodelage osseux dure environ 8 mois. Il débute en premier lieu par **l'activation des cellules bordantes** recouvrant la surface osseuse. Ces cellules ont pour rôle d'empêcher les ostéoclastes d'entrer en contact avec la MEC. Lors de la phase d'activation, des **composés ostéorésorbants** (Parathyroïdine, vitamine D3) permettent la **rétractation des cellules bordantes** et l'adhésion des ostéoclastes à la matrice osseuse.

La **phase de résorption osseuse** peut alors commencer : le tissu osseux est détruit par les ostéoclastes. Cette phase dure environ 30 jours et se déroule en deux étapes. Tout d'abord la phase minérale du tissu osseux est dissoute par **acidification**, puis des **enzymes protéolytiques lysosomales** vont permettre la dégradation de la matrice organique. Une lacune de résorption, nommée **lacune de Howship**, est alors créée, nécessitant une **phase d'inversion**. Celle-ci dure 1 à 2 semaines : des macrophages vont remplacer les ostéoclastes et permettre le **lissage de la lacune**. C'est pendant cette transition que la phase de formation osseuse se mettra en place.

La **phase de formation osseuse** dure entre 3 et 6 mois. Il s'agit de l'élaboration du tissu osseux passant par la **synthèse de la matrice organique** jusqu'à sa **minéralisation**. Tout d'abord, les cellules ostéoprogénitrices de la lacune se différencient en ostéoblastes. Ils sont

responsables de la synthèse de la nouvelle matrice organique à la surface d'une matrice organique minéralisée préexistante, c'est **l'apposition osseuse**. Les ostéoblastes comblent la lacune de Howship et produisent du collagène de type I mais aussi toutes les protéines qui seront nécessaires à la minéralisation de la matrice.

Le **processus de minéralisation** est un processus complexe nécessitant des concentrations seuils en ions calcium et phosphate. L'ostéocalcine et les ostéoblastes jouent un rôle dans la concentration en calcium et en phosphate nécessaire afin de former des **cristaux d'hydroxyapatite**. Le processus de minéralisation fait intervenir de petites vésicules (**vésicules matricielles**) de la MEC mais également de la membrane plasmique des ostéoblastes (Anderson, 1995). Riches en phosphatase alcaline, ces vésicules jouent le rôle de **réservoirs de calcium et de phosphate**. La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse des liaisons organophosphates et initie la minéralisation en libérant des ions phosphate (Beertsen and Van den Bos, 1992). D'autre part, l'**ostéocalcine** capte des ions calcium extracellulaires et favorise la **nucléation des cristaux par précipitation** des ions minéraux sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. Les dépôts de minéraux s'accroissent et les parties minéralisées croissent par accrétion à tel point que la matrice organique est complètement minéralisée. Par la suite, une partie des ostéoblastes **se différencie en ostéocytes**, ceux-ci se retrouvent ainsi enfermés dans la matrice minéralisée. D'autres ostéoblastes entrent en apoptose ou bien se transforment en cellules bordantes. Elles recouvrent la majorité de la surface osseuse et comme en début de cycle de remodelage empêche tout contact entre ostéoclastes et matrice osseuse, c'est la **phase de quiescence**.

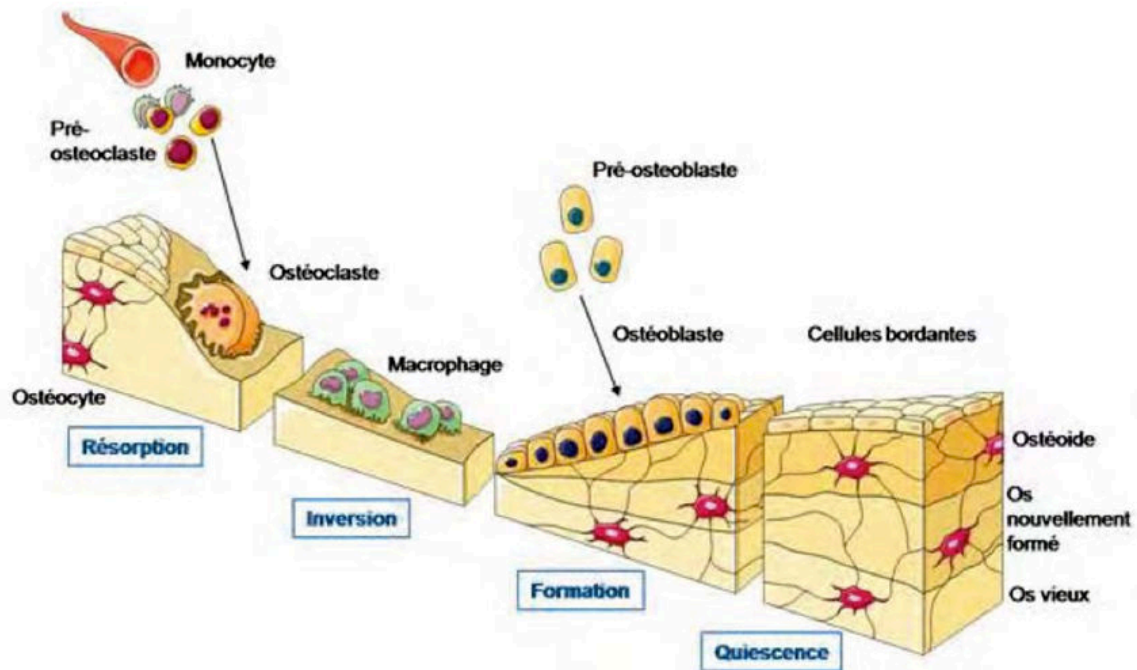


Figure 4: Schéma du cycle du remodelage osseux (Depalle, 2011)

Nous venons de voir que l'os est un tissu capable de se remodeler et de s'auto-réparer. Toutefois, dans certains cas le manque osseux est tel que les capacités auto-régénératrices du tissu osseux deviennent insuffisantes. L'utilisation de biomatériaux est alors nécessaire afin d'aider à la régénération osseuse.

1.2. La régénération osseuse et les biomatériaux synthétiques

1.2.1. La médecine régénérative osseuse

Dans le domaine de la régénération osseuse, les traumatismes osseux sont très divers qu'il s'agisse de l'origine du traumatisme, de sa localisation ou encore de la taille de la lésion osseuse. Il existe trois principaux domaines d'application directement liés à la taille de la lésion osseuse. En effet, lorsque la lésion est trop importante et qu'il est nécessaire de remplacer partiellement ou complètement l'os, les **prothèses orthopédiques** sont alors utilisées afin de se substituer à l'organe défectueux. Les lésions de taille intermédiaire sont traitées à l'aide de

substituts osseux (**les biomatériaux de comblement**) : ce sont souvent des biomatériaux sous forme de gels ou de granulés servant au comblement osseux et destinés à remplir l'espace lésé. C'est donc au niveau des lésions de petite taille que l'ingénierie osseuse et tout particulièrement la nanomédecine régénérative osseuse peuvent intervenir. C'est dans ce domaine d'application que s'intègre mon sujet de thèse.

L'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative ont pour but de réparer voir de régénérer partiellement ou entièrement des tissus ou organes endommagés suite à des maladies, traumatismes ou encore des réparations compromises. La médecine régénérative osseuse s'appuie aujourd'hui sur les connaissances accumulées dans le domaine de l'ingénierie du tissu osseux. En effet, la **MEC** a tout d'abord été considérée comme étant uniquement un support passif nécessaire au développement des cellules. Cependant, des recherches ont ensuite mis en évidence le **rôle crucial** qu'elle joue en tant que nanocomposite dans la **régulation de fonctions essentielles** aux cellules telles que la morphogenèse, la prolifération, la différenciation, l'adhésion ou encore la migration cellulaire (Dvir et al., 2011). C'est pourquoi les recherches se sont orientées vers le développement et la conception de supports capables d'**imiter au mieux la structure complexe** que constitue la MEC (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2013). Toutefois, recréer l'environnement extracellulaire dans son intégralité est un challenge difficile car les nombreux mécanismes contrôlant la formation des tissus n'ont pas encore été totalement identifiés et compris (Dvir et al., 2011).

Le meilleur substitut au tissu osseux reste encore l'os lui-même, et tout particulièrement l'os du patient. Ainsi, l'**autogreffe** reste la solution idéale pour éviter tout rejet ou infection. Cependant cette méthode présente certaines limites : une quantité d'os disponible limitée, la nécessité d'opérer le patient sur deux sites, et parfois une qualité du tissu osseux compromise, en particulier chez les personnes âgées et/ou chez les patients présentant des maladies osseuses (l'ostéoporose par exemple) (Nkenke and Neukam, 2014). De même, les **allogreffes** (tissus provenant d'un autre être humain) et les **xénogreffes** (tissus d'origine animale) peuvent s'avérer **moins efficaces**. Elles nécessitent un **traitement immunosuppresseur** pour éviter les rejets, et le **risque de transmission de maladie** ne peut être éliminé. Des **problèmes d'éthique** peuvent également se poser. Par ailleurs, certaines croyances religieuses peuvent poser des difficultés vis-à-vis de l'utilisation de tissus d'origine animale (origine porcine par exemple). (Peroglio, 2008 ; Ledford et al., 2013 ; Campana et al., 2014).

Les implants développés à partir de **biomatériaux synthétiques** représentent donc une solution non négligeable car ils présentent comme avantage une **disponibilité illimitée** et une **absence de risques de transmission de maladies**. Idéalement, un implant destiné à l'ingénierie tissulaire doit être en premier lieu **biocompatible** : l'implant ne doit pas induire de réaction inflammatoire, ni être immunogénique ou cytotoxique. Il doit être **biodégradable** avec éventuellement une cinétique de dégradation correspondant à la croissance des cellules et des tissus devant le remplacer, et les produits de dégradation ne doivent pas entraîner de réactions inflammatoires. D'autres propriétés sont à prendre en considération telles que la **porosité** de la membrane avec des pores interconnectés de tailles suffisantes (au moins **100 µm** et un taux de porosité d'environ **90 %**) (Karageorgiou and Kaplan, 2005), ou encore la **structure fibreuse** de taille nanométrique afin d'imiter au mieux la MEC. De telles propriétés structurelles sont cruciales afin de permettre l'**ostéoconduction** de l'implant, c'est-à-dire l'infiltration et la croissance cellulaire, la vascularisation, le transport à travers l'implant des nutriments nécessaires à leur prolifération, et l'évacuation des déchets générés par la vie cellulaire. De plus, des propriétés mécaniques minimales sont nécessaires à la **manipulation chirurgicale**, et des **propriétés de surface** adaptées favorisent l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Toutes ces propriétés doivent permettre l'**ostéointégration** de l'implant biodégradable, c'est-à-dire qu'il doit s'intégrer parfaitement dans le tissu osseux receveur sans formation de tissu fibreux anormal à l'interface (Albrektsson and Johansson, 2001; Polo-Corrales et al., 2014). Afin d'améliorer la reconstruction du tissu osseux, des propriétés d'activité biologique permettant d'engendrer l'**ostéoinduction** peuvent être développées grâce à l'ajout de **molécules bioactives** (Mendoza-Palomares et al., 2012; Polo-Corrales et al., 2014). L'ostéoinduction est la capacité à induire la **différenciation cellulaire** de cellules pluripotentes vers la lignée ostéoblastique. Une autre méthode peut être d'ajouter des cellules du patient afin de favoriser la régénération osseuse.

En résumé, l'implant synthétique doit :

- être **biocompatible**,
- être **biodégradable** avec des produits de dégradation non toxiques,
- présenter une **structure poreuse** avec des pores interconnectés pour favoriser la vascularisation et la colonisation cellulaire,
- mimer au mieux la matrice extracellulaire et présenter une **structure nanofibreuse** pour permettre l'adhésion cellulaire et encourager la prolifération et la migration cellulaire

- posséder des **propriétés mécaniques suffisantes** pour permettre sa manipulation et supporter la néoformation du tissu,
- engendrer la **différenciation ostéogénique**,
- libérer des **molécules biologiquement actives** de manière contrôlée.

Différents **polymères biodégradables**, notamment les **polyesters**, peuvent être utilisés afin de concevoir des biomatériaux adéquats à la régénération osseuse et répondants aux contraintes et besoins requis à cette application.

1.2.2. Les polymères biodégradables : avenir de la régénération osseuse

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et des applications biomédicales, développer un biomatériau à partir d'un polymère naturel semble être la solution intuitivement logique. En effet, plusieurs polymères naturels ont été et sont toujours utilisés dans la recherche à des fins d'ingénierie osseuse tels que le collagène (Lee et al., 2001 ; Keogh et al., 2010), l'acide hyaluronique (Solchaga et al., 1999 ; Kisiel et al., 2013) ou encore l'amidon (Salgado et al., 2002 ; Requicha et al., 2014). Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment, des **risques de transmission de maladies** existent lors de l'utilisation de matériaux d'origine humaine ou animale. De plus, l'approvisionnement de ces matériaux est limité, leurs propriétés peuvent être variables et leur mise en œuvre peut être difficile. C'est pourquoi, il est plus judicieux d'opter pour un **polymère synthétique**. En effet, les polymères synthétiques sont moins onéreux, leurs propriétés sont prédictibles et leur mise en œuvre reproductible. Il existe un large choix de polymères synthétiques pouvant être utilisés dans l'ingénierie osseuse, mais nous nous intéresserons plus particulièrement aux **polyesters aliphatiques** (Liang et al., 2007 ; Girones Molera et al., 2012 ; Ghasemi-Mobarakeh et al., 2013). Ainsi, grâce à leur biocompatibilité et leur biodégradabilité, les polyesters aliphatiques sont adaptés pour des applications biomédicales (Girones Molera et al., 2012).

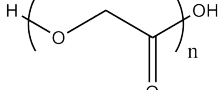
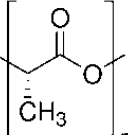
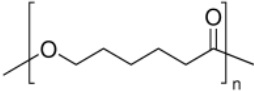
Polyesters	Structure chimique	Temps de dégradation (mois)
PGA		6- 12
PLLA		12-16
PCL		>24

Tableau 1 : Structure chimique et temps de dégradation de différents polyesters (Yang et al., 2001; Cipitria et al., 2011)

Les polyesters sont des polymères constitués d'une chaîne carbonée composée de **fonctions esters**, ils sont synthétisés chimiquement. Les membranes à base de polyesters sont **biocompatibles**, généralement **biodégradables** et permettent une **bonne intégration des tissus** au site d'implantation. Les polyesters les plus connus et utilisés dans le domaine biomédical sont le **poly(ϵ -caprolactone) (PCL)**, l'acide polylactique (PLA), et l'acide polyglycolique (PGA) qui sont tous **approuvés par la FDA** (US Food and Drug Administration) (Kehoe et al., 2012; Mkhabela and Ray, 2014). De nombreuses recherches ont été menées en combinant ces différents polymères par des mélanges ou par copolymérisation afin de créer des matériaux hybrides dont les propriétés sont améliorées (Zhen and Jiandong, 2012; Zong et al., 2014). Cependant, notre intérêt se portera essentiellement sur les homopolymères dont les structures chimiques sont présentées dans le **tableau 1**.

Un critère très important intervenant dans le choix du polymère à utiliser quant à une application dans l'ingénierie osseuse est le **temps de dégradation** du matériau en question. En effet, de nombreux facteurs peuvent être des catalyseurs potentiels de la **dégradation hydrolytique** de ces polyesters. Les contraintes mécaniques, les frottements, ou encore les contraintes biochimiques de l'environnement dans lequel le matériau se trouvera sont autant de facteurs pouvant intervenir dans sa dégradation. La biodégradation des polyesters passe par des réactions enzymatiques et non-enzymatiques comme l'**hydrolyse**. Cependant, la dégradation par voie enzymatique n'est pas prédominante, c'est principalement par l'hydrolyse que les matériaux sont dégradés (Lyu and Untereker, 2009). Cette réaction se produit en **milieu aqueux** par

scission aléatoire des chaînes de polymères. Elle entraîne une diminution progressive du poids moléculaire du polymère et engendre des produits de dégradation permettant l'autocatalyse de la réaction. Ces produits de dégradation sont **non toxiques** (ex : acide pyruvique ou lactique, produits de la digestion des hydrocarbonates) et peuvent être éliminés par **érosion enzymatique** ou bien par **phagocytose** (Li and Vert, 1995 ; Hutmacher, 2008). Selon le type de polyester le temps de dégradation peut être variable (**Tableau 1**) (Middleton and Tipton, 2000; Yang et al., 2001 ; Cipitria et al., 2011). Le PGA présente un temps de dégradation bien inférieur au PLA ou au PCL qui se dégradent beaucoup plus lentement. Cependant, les temps mentionnés dans le **tableau 1** ne sont qu'indicatifs car ils ne concernent que la dégradation d'une forme massive de ces matériaux donc une forme non fibreuse ne présentant qu'une faible surface spécifique (ex : film coulé). En effet, les nanofibres présentent une **surface spécifique très importante** ce qui a pour conséquences **d'accélérer le processus de dégradation** du matériau (Bolgen et al., 2005).

Compte tenu de l'application visée, il est nécessaire que les membranes présentent des **temps de dégradation élevés**. Au vue de la durée d'un cycle de remodelage osseux, des temps de dégradation d'au moins 8 mois sont nécessaires afin que la membrane puisse favoriser l'ostéoconduction et la colonisation cellulaire, et servir de soutien à la synthèse matricielle et au processus de régénération osseuse au niveau de la lésion. Ainsi, le polymère présentant le temps de dégradation le plus long, ici le **PCL**, nous paraît le plus intéressant et le meilleur choix pour notre application.

En plus de présenter un **temps de dégradation lent** adapté à notre application, le PCL est **biocompatible** et **peu coûteux**. C'est un polyester aliphatique, **linéaire** et **semi-cristallin**, composé de chaînes d'hexanoates (**Tableau 1**). Il présente une température de transition vitreuse de -62°C et sa température de fusion est de 55-60°C selon son taux de cristallinité. Il est approuvé par la FDA et déjà **utilisé en clinique** en tant que matériel de suture (Monocryl®) ou pour la libération contrôlée de molécules actives (Capronor®). Grâce à ses propriétés mécaniques, viscoélastiques et rhéologiques, le PCL est un matériau de choix pour la conception de « scaffold » (Cipitria et al., 2011). C'est grâce à sa nature semi-cristalline et à son *hydrophobie* que le PCL se dégrade lentement. Cependant, sa nature hydrophobe pourrait engendrer une mauvaise adhésion cellulaire. Ceci pourrait être pallié par des modifications de surface en fonctionnalisant le matériau par des liaisons chimiques covalentes, par adsorptions physiques de protéines ou encore grâce à des traitements par plasma. Enfin, le PCL est facile à

mettre en œuvre car il se solubilise facilement dans les solvants tels que le chloroforme, ou le dichlorométhane (DCM). En revanche, il est insoluble dans les alcools et l'eau (Sinha et al., 2004).

Nous allons nous intéresser aux **biomatériaux** destinés à la **médecine régénérative** osseuse et à leurs différentes **techniques de fabrication**. Nous présenterons la première génération de biomatériaux ayant été développée : les **biomatériaux inertes**. Nous présenterons ensuite les composés et molécules susceptibles d'aider au processus de régénération osseuse rendant ainsi les **biomatériaux actifs**. Et enfin, nous parlerons de la dernière génération de biomatériaux, les **biomatériaux vivants**.

1.3. Les biomatériaux

1.3.1. Biomatériaux inertes et techniques de mise en œuvre

Les recherches se sont concentrées sur le développement de **membranes synthétiques biodégradables** dans le but de réduire au minimum la réponse biologique de l'hôte par rapport à l'implant étranger. Les polymères les plus couramment utilisés dans le domaine biomédical sont les polyesters (Bottino et al., 2012; Oryan et al., 2014).

De nombreuses techniques ont été développées afin de fabriquer des membranes poreuses à base de polymères biodégradables pour des applications en ingénierie tissulaire. Nous ne citerons que les techniques les plus couramment utilisées telles que la **technique de lixiviation de porogènes**, appelée aussi « solvent casting/particulate leaching », la **technique de séparation de phase thermiquement induite**, ou encore la technique de l'électrofilage ou plus communément appelée **electrospinning**.

La **technique de lixiviation de porogènes** est basée sur l'utilisation d'une solution de polymère dans laquelle est ajouté un sel inorganique (par exemple le chlorure de sodium) sous forme de poudre et dont la granulométrie est choisie en fonction de la taille des pores désirée (Chen

and Ma, 2004; Columbus et al., 2014). Ce sel est également insoluble dans le solvant utilisé afin de solubiliser le polymère. Après évaporation du solvant, une membrane de polymère est obtenue. Le sel est ensuite éliminé par lavage afin d'obtenir une structure poreuse dont les pores sont de taille connue (**Figure 5**). En raison de l'agglomération des particules du sel lors de l'évaporation du solvant, il est possible mais difficile de contrôler la porosité de la structure en ajustant le **ratio sel/polymère**. Une autre limite de cette technique se trouve dans **l'absence d'interconnexion entre les pores** au sein de la structure, limitant ainsi le passage des nutriments et la migration cellulaire. De plus, les solvants organiques couramment utilisés dans ce procédé peuvent avoir des effets néfastes au niveau tissulaire lors de l'implantation.

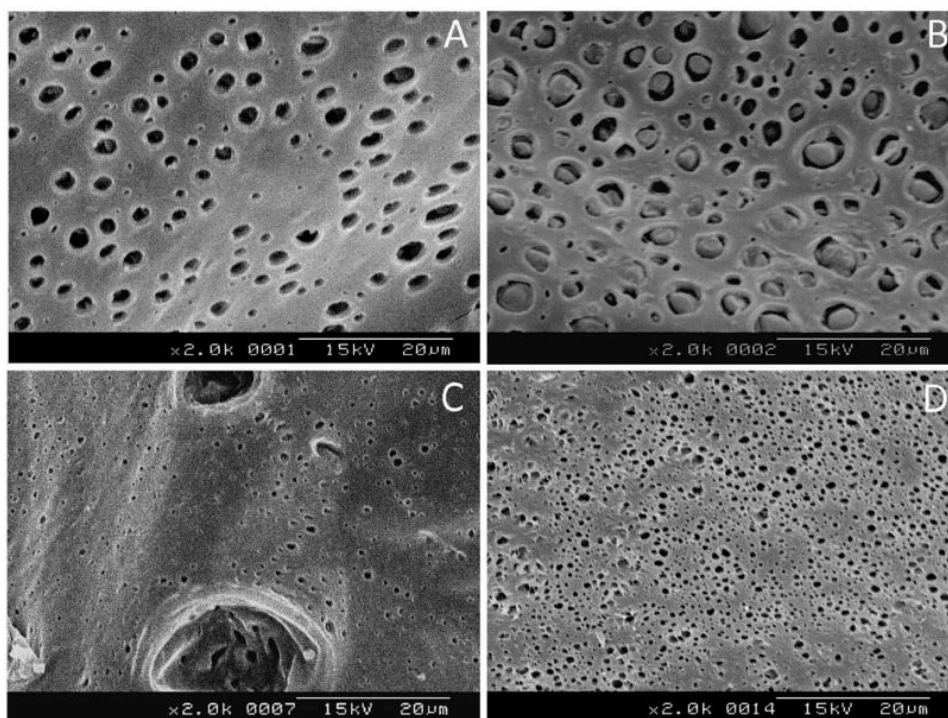


Figure 5: Observation au MEB de membranes de PCL préparées par lixiviation de porogène de différentes tailles de granulation (Columbus et al., 2014)

La **technique de séparation de phase thermiquement induite** se base sur la **démixtion** d'une solution de polymère en une phase riche en polymère et une phase pauvre en polymère. Un **refroidissement brutal** (ou trempe) de la solution de polymère à une température inférieure à la température de solidification du solvant permet la **séparation de phase** de la solution et va figer celle-ci. Le solvant sera ensuite éliminé par lyophilisation formant alors une **structure poreuse** avec des pores de taille micrométrique (Nam and Park, 1999 ; Bandyopadhyay et al., 2013). Les

deux principaux inconvénients de la technique sont la durée de la lyophilisation qui peut durer plusieurs jours, et la taille des pores qui est faible et peut donc **limiter la colonisation cellulaire**.

La **technique de l'électrospinning** est un procédé de mise en œuvre permettant la formation de **membranes nontissées**, constituées de fibres enchevêtrées dont le diamètre est compris entre **quelques dizaines de nanomètres à quelques microns**. Cette technique est réalisée principalement par voie solvant mais la mise en œuvre existe également par voie fondue. Elle met en jeu des **forces électrostatiques** afin de produire des fibres de diamètre extrêmement faible. Des structures particulières telles que des fibres creuses ou cœur/écorce peuvent être obtenue par électrospinning coaxial. Des dispositifs d'électrospinning particuliers permettent également de produire des membranes aux fibres alignées, ou encore présentant des **structures nano-architecturées**.

Le dispositif d'électrospinning est simple (**Figure 6**), il est composé de :

- un générateur haute tension
- une seringue contenant une solution de polymère
- un pousse-seringue
- une aiguille reliée à la seringue par un tuyau
- un collecteur conducteur

Une enceinte permettant de contrôler la température, la pression, et l'humidité peut être ajoutée.

Une **différence de potentiel** est appliquée entre l'aiguille et le collecteur, ce champ électrique va charger la solution de polymère au niveau de l'aiguille. Sous l'influence des **forces électrostatiques**, la solution en bout d'aiguille va s'allonger et former un cône appelé **cône de Taylor**. Lorsque le champ atteint une valeur seuil telle que les **forces de répulsion électrostatique** deviennent supérieures à la **tension de surface** de la solution, **un jet** se forme à la pointe du cône et est éjecté jusqu'au **collecteur**. Avant d'atteindre le collecteur, le solvant s'évapore, les fibres de polymère chargées se déposent alors aléatoirement sur celui-ci formant un **voile de nanofibres** à sa surface (Doshi and Reneker, 1995). La formation du jet est principalement due au mouvement des charges à la surface et dans la solution de polymère. Ce jet peut être décomposé en quatre parties : la base constituée du **cône de Taylor**, **le jet**, la **zone d'instabilité** du jet, et la **zone de déposition** plus couramment appelée collecteur (Vaquette, 2008) (**Figure 6**).

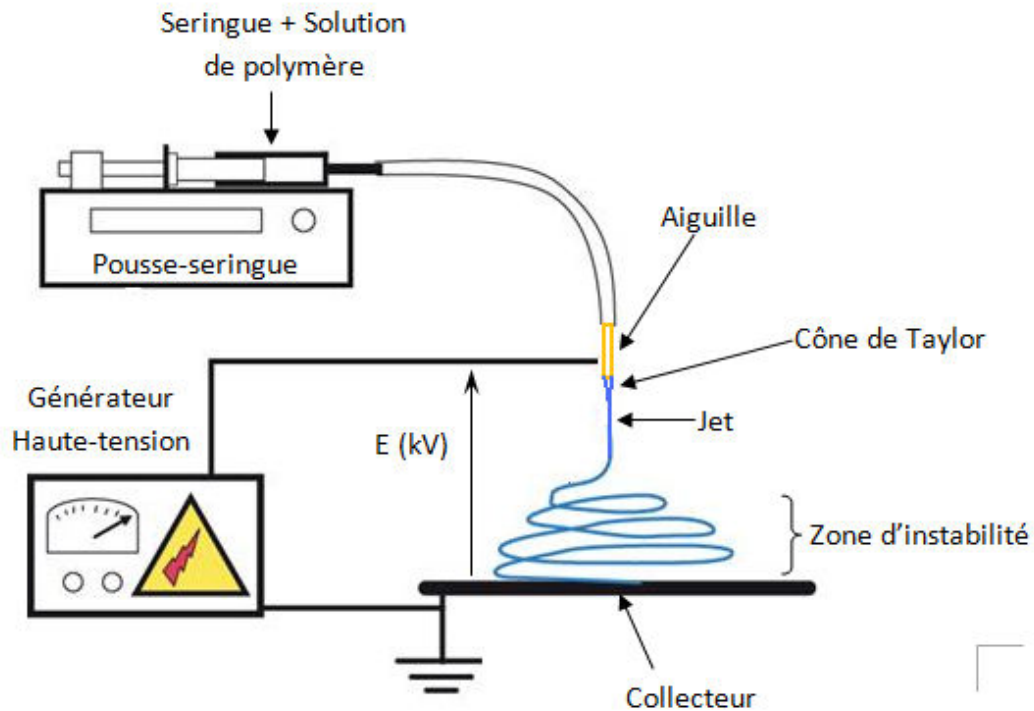


Figure 6: Schéma du montage de l'électrospinning

De nombreux paramètres peuvent influencer la morphologie des fibres obtenues lors de l'électrospinning. En effet, il y a les paramètres liés à la solution de polymère elle-même tels que la **concentration de la solution**, les **solvants** choisis, ou encore la **conductivité** et la **viscosité** de la solution. Les paramètres liés à l'appareillage doivent également être pris en compte : la **tension**, le **débit**, la **distance aiguille/collecteur**. Enfin, les paramètres liés aux conditions atmosphériques (la **température**, l'**hygrométrie**) sont également importants. Les paramètres les plus importants sont la concentration en polymère et le choix des solvants utilisés dont dépendent la conductivité, la viscosité, et la tension de surface de la solution de polymère. En effet, une des conditions critiques afin que l'électrospinning se déroule sans accroc est **l'obtention d'un jet continu et stable** durant l'expérience, pour cela il est nécessaire que les chaînes du polymère dilué soient enchevêtrées. La **concentration** en polymère ainsi que sa **masse molaire** sont primordiales car elles influent sur la viscosité de la solution et sur la continuité et la stabilité du jet. De plus, la concentration en polymère influe également sur le diamètre des fibres (**Figure 7A**), et sur la formation ou non de défauts au niveau des fibres tels que les « **beads** » (Moghe et al., 2009). Les beads sont des **structures irrégulières** ressemblant à des gouttes à l'intérieur des fibres (**Figure 7B**). Par ailleurs, le choix du ou des solvants à utiliser permet de déterminer une viscosité adéquate pour l'électrospinning. Les mélanges de solvants

sont souvent utilisés afin de pouvoir ajuster la viscosité de la solution mais aussi de jouer sur la vitesse d'évaporation du solvant lors du trajet aiguille/collecteur.

Un autre paramètre important de la solution de polymère est sa **conductivité** puisque la formation de fibres est essentiellement due aux interactions entre les charges contenues dans la solution à l'origine du jet. La conductivité est principalement contrôlée par l'utilisation de **mélange de solvants** ou encore par l'**apport d'ions** dans la solution. Ainsi, lorsque la conductivité augmente par ajout de sels ou de polyélectrolytes, le diamètre des fibres et la densité des beads tendent à diminuer (Pham et al., 2006; Vaquette, 2008).

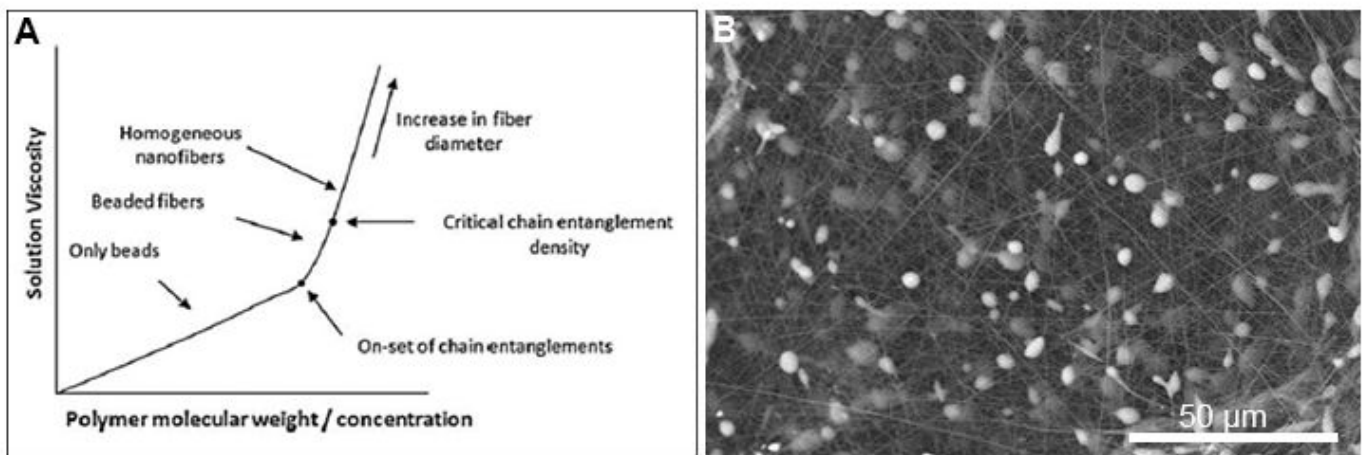


Figure 7: Influence de l'enchevêtrement des chaînes de polymère sur la morphologie des fibres électrospinnées (Moghe et al., 2009) (A). Observation au MEB à partir d'une membrane électrospinnée de PCL (B).

De par sa **facilité de mise œuvre** ainsi que par les caractéristiques de la membrane obtenue en terme de **taille de fibre et de porosité**, l'électrospinning est la technique que nous avons choisie afin de développer notre technologie de **membranes nanofibreuses synthétiques** pour la régénération osseuse. De plus, afin d'augmenter l'efficacité de ces membranes synthétiques biodégradables, des molécules biologiquement actives peuvent être utilisées afin **d'augmenter l'ostéoinduction et améliorer leurs propriétés d'ostéoconduction**. C'est pour cela qu'une deuxième génération de biomatériaux, les **biomatériaux actifs**, a été développée dans le but d'engendrer ou de moduler une réponse biologique souhaitée de la part de l'hôte.

1.3.2. Biomatériaux actifs et facteurs de croissance

Afin d'engendrer une **activité biologique** au sein de membranes synthétiques, les molécules principalement utilisées sont des **facteurs de croissance**. Les principaux facteurs de croissance à mentionner sont le **TGF β** (Transforming Growth Factor) et les **BMPs** (Bone Morphogenetic Proteins). Le **TGF β** se retrouve en abondance dans la matrice osseuse. Il influe sur la **prolifération cellulaire**, la **synthèse matricielle**, et la **résorption osseuse**. En effet, il peut ralentir la résorption osseuse en inhibant la prolifération ostéoclastique et les précurseurs conduisant à la maturation des oséoclastes (Linkhart et al., 1996). De plus, injecté au niveau d'une lésion osseuse, il en **stimule la régénération**. Cependant, il doit être injecté à **haute dose** afin d'être efficace et ne peut pas induire de formation osseuse en site ectopique (site non osseux). Les **BMPs** sont les seules **molécules ostéoinductrices** connues. Elles sont capables **d'induire la néoformation** d'un tissu osseux en site ectopique par leur action sur des cellules mésenchymateuses se différenciant en cellules ostéoprogénitrices (Kusumoto et al., 1996; Oda et al., 1997). Certaines BMPs stimulent la prolifération cellulaire des ostéoblastes *in vitro* et *in vivo*. Les BMP-2, 6 et 9 agissent sur la **différenciation des progéniteurs** en préostéoblastes (Yamaguchi et al., 1991 ; Song et al., 1995), tandis que les BMP-4 et 7 permettent la **différenciation des préostéoblastes** en ostéoblastes (Sammons et al., 2004; Maurer et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Actuellement, l'extraction des BMPs peut être effectuée à partir des os bovins déminéralisés ou elles peuvent être élaborées par génie génétique, on les appelle alors **BMPs recombinantes (rhBMPs)**. Cette technique permet d'obtenir des produits purs en grande quantité et de limiter les risques de contaminations par des agents pathogènes. La rhBMP-2 et la rhBMP-7 ont été **approuvées par la FDA** pour des **applications thérapeutiques** chez l'homme et sont d'ailleurs utilisées en clinique en combinaison avec des membranes de collagène ou seules en solution.

D'autres composés tels que l'**hydroxyapatite** et les **ciments phospho-calciques** sont connus pour être **ostéoconducteurs** (Porter et al., 2009 ; Oryan et al., 2014) et peuvent également aider à améliorer les propriétés des supports implantables. Afin d'intégrer de façon durable de tels composés ostéoconducteurs ou ostéoinducteurs au sein des membranes

synthétiques, différentes **techniques de fonctionnalisation** ont été développées par les chercheurs. Des recherches ont été menées afin de développer des structures combinant des polymères naturels et synthétiques (Catledge et al., 2007; Mota et al., 2014), mais également afin de **fonctionnaliser les membranes** pour les rendre **actives**. Ainsi, la dégradation rapide des molécules bioactives, la nécessité d'obtenir leur **libération contrôlée et continue** a conduit au développement de techniques de fonctionnalisation adaptées aux structures de support synthétique.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les polymères les plus utilisés dans la mise en œuvre des membranes implantables pour des **applications biomédicales** sont des polymères synthétiques biocompatibles et biorésorbables. En effet, leur mise en œuvre et le contrôle de la morphologie des nanofibres s'avèrent plus faciles que pour les polymères naturels qui tendent à perdre certaines caractéristiques nécessaires aux interactions biologiques. Afin **d'améliorer les propriétés biologiques** de ces biomatériaux synthétiques et les rendre bioactifs, la recherche s'est tournée vers la **fonctionnalisation des surfaces nanofibreuses** des polymères synthétiques permettant l'intégration de polymères naturels, protéines, ou substances bioactives sans altération de leurs propriétés. De telles surfaces fonctionnalisées sont capables **d'agir directement sur les cellules** (adhésion et prolifération cellulaire par exemple) et **d'influer sur leur développement biologique**. La fonctionnalisation de surface de membranes nanofibreuses peut être réalisée par différentes techniques : traitement plasma, méthode chimique, greffage, co-electrospinning, addition de nanoparticules, ou encore **assemblages multicouches de polyélectrolytes** (Yoo et al., 2009 ; Dvir et al., 2011; Bottino et al., 2012). D'autre part, améliorer les propriétés mécaniques des membranes par fonctionnalisation afin de s'approcher au maximum des caractéristiques osseuses a également fait l'objet de recherches poussées (Zuk et al., 2001 ; Yen et al., 2005 ; Margossian et al., 2012).

Différentes méthodes ont été développées selon la composition chimique de la molécule ou du composé actif, et selon le temps de libération souhaité. On peut distinguer trois types de méthodes de fonctionnalisation:

- des méthodes de fonctionnalisation directement liée à la formulation,
- des méthodes de fonctionnalisation par liaison chimique,
- des méthodes de fonctionnalisation par adsorption physique.

➤ *Méthodes de fonctionnalisation liée à la formulation*

Au vu des très nombreuses techniques de fabrication des membranes synthétiques et de leur méthode de fonctionnalisation, nous citerons uniquement les méthodes de fonctionnalisation liées à l'électrospinning.

Produire des **matériaux composites** présentant de meilleures caractéristiques que leurs composants pris séparément est une des méthodes de fonctionnalisation. Il est possible d'incorporer des composés actifs tels que des **antibactériens** (Rujitanaroj et al., 2008) ou des **antibiotiques** (Huang et al., 2006) **directement dans la formulation** de la solution de polymère avant électrospinning. Également effectuée par co-electrospinning de nanoparticules, cette technique a montré une modification de la morphologie des fibres : surface plus rugueuse des composites **PCL/hydroxyapatite** (Thomas et al., 2006), et augmentation des propriétés mécaniques (résistance à la traction et module d'Young). De nombreux composites ont été étudiés (Zuk et al., 2001 ; Hench and Polak, 2002; Zhang et al., 2010b)., l'assemblage **PCL/collagène/hydroxyapatite** a fait l'objet d'une comparaison de ses propriétés mécaniques avec différents types de composites, il en ressort que le **collagène** joue un rôle important dans **l'amélioration des propriétés mécaniques** (Figure 8). Le collagène engendre également une **meilleure mouillabilité**. De plus, il semblerait que les cristaux en favorisant des liaisons interfibres augmentent encore la résistance de la membrane à la déformation et favorise la minéralisation (Catledge et al., 2007; Venugopal et al., 2007) .

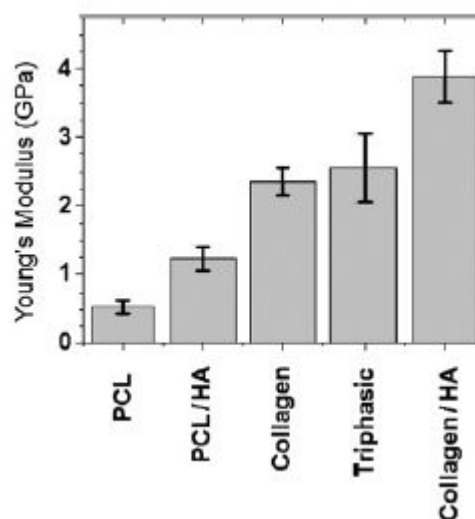


Figure 8: Mesure du module d'élasticité par nanoindentation de membranes composites (Catledge et al., 2007)

On peut également citer le composite **PCL/hydroxyapatite/gélatine** qui améliore la réponse biologique des ostéoblastes humains, comparé au PCL seul. Ainsi, la prolifération cellulaire et la minéralisation sont meilleures. Ce composite favorise l'adhésion et la croissance des ostéoblastes, il stimule les cellules osseuses pour la minéralisation, et il possède une structure flexible permettant une meilleure infiltration cellulaire (Venugopal et al., 2008).

Une autre étude a montré que les fibres PCL/CaCO₃ présentent des propriétés mécaniques plus faibles d'où une membrane finale composée de deux couches de fibres PCL/CaCO₃ et d'une couche de PCL simple servant de support mécanique. L'adhésion et la prolifération cellulaire sont également augmentées (Fujihara et al., 2005).

L'**electrospinning co-axial** est une autre technique permettant d'incorporer la molécule active uniquement à **l'intérieur de la fibre**. Deux solutions sont acheminées à travers un système d'aiguilles coaxiales. Une fibre du type **cœur/écorce** se forme : le cœur pouvant correspondre à une molécule bioactive, et l'écorce pouvant être composée d'un polymère permettant à la fois la protection mais aussi la libération continue de la molécule active contenue dans le cœur. Grâce à cette technique, des antioxydants, des antibiotiques, et même des bactériophages ont été encapsulés à l'intérieur de fibres électrospinnées (Friedenstein et al., 1968; Bianco and Robey, 2001; Huang et al., 2006).

Enfin, il est également possible de combiner **electrospinning et electrospraying**. Une solution de polymère est électrospinnée pendant qu'une solution de molécules actives est électrosprayée sur le même collecteur. Le polymère forme les fibres de la membrane électrospinnée, tandis que les composés ajoutés se trouvent à l'intérieur ou à la surface des fibres sous forme de particules. Cette méthode a récemment permis de concevoir un composite à base de fibres de poly(3-hydroxybutyrate) fonctionnalisées à l'aide de nanoparticules d'hydroxyapatite pour l'ingénierie osseuse (Ramier et al., 2014).

Toutefois, les facteurs de croissance tels que les BMPs sont des **protéines conformationnelles**, c'est-à-dire que leur activité biologique dépend directement de leur conformation dans l'espace. En tenant compte des conditions drastiques de mise en œuvre du procédé, il est très difficile voire impossible d'ajouter directement ces molécules dans la formulation sans les dégrader ou influencer leur activité biologique par la suite. D'autre part, le

coût très élevé de ces principes actifs limitent excessivement la possibilité de les utiliser directement dans la formulation.

➤ *Méthode de fonctionnalisation par liaison chimique*

Il est également possible de fonctionnaliser les membranes par **liaison chimique** entre la molécule active et la surface des nanofibres. Un **couplage chimique réversible** ou **irréversible** peut être réalisé en fonction du principe actif et de sa cible thérapeutique. Cependant, lors d'un greffage chimique une liaison covalente se crée entre deux composés, le risque est que la modification chimique de la molécule active engendrée par cette liaison covalente entraîne une perte d'activité de celle-ci.

D'autre part, la membrane est déjà électrospinnée et doit subir des traitements afin d'obtenir des **groupements réactifs** en surface pour permettre un **greffage des molécules actives**. Des techniques de **traitement plasma** ou UV permettent de modifier chimiquement la surface de la membrane. Une modification chimique implique la création de nouveaux groupes fonctionnels pouvant améliorer l'adhésion cellulaire en augmentant l'hydrophilie de la surface auxquels pourront éventuellement s'attacher des substances bioactives. Le traitement plasma utilise un mélange gazeux introduit dans une chambre sous vide contenant l'échantillon à traiter. Puis, un champ électrique est appliqué pour activer les molécules de gaz. Des **surfaces hydrophiles** peuvent être obtenues grâce aux plasmas de gaz tels que l'argon, l'azote, l'ammoniac, le dioxygène ou le dioxyde de carbone (Park et al., 2007; Prabhakaran et al., 2008). Selon la source de plasma utilisée, des **groupements carboxyles, amines ou hydroxyles** peuvent être créés à la surface de l'échantillon. Ces groupements chimiques peuvent permettre par la suite le **greffage covalent** de divers composés de la MEC. Il permet d'introduire durablement des groupes multifonctionnels afin d'améliorer la mouillabilité et les propriétés de biocompatibilité et d'adhésion cellulaire (Koh et al., 2008). Cependant, le greffage direct de la molécule bioactive à la surface du biomatériau peut limiter son action sur l'adhésion et de la prolifération cellulaire. En effet, l'accès à la molécule active par les cellules peut être difficile en raison de **gênes stériques** engendrées par la structure du biomatériau (Yoo et al., 2009). Pour éviter cela, des **groupements espaceurs** peuvent être utilisés entre la molécule active et la

surface. Des polymères tels que le poly(éthylène glycol) (PEG) peuvent être utilisés dans ce but (Young et al., 1992 ; Lee et al., 1995; Yoo et al., 2009). Il est d'ailleurs utilisé pour greffer des facteurs de croissance (Choi et al., 2008a) et des peptides d'adhésion tel le RGD (Choi et al., 2008b).

Une méthode chimique peut être également utilisée si le matériau à traiter possède des **groupements hydrolysables** tels que les groupements esters afin de créer des **groupements hydrophiles**. En conditions acides ou basiques, des groupements carboxyles et hydroxyles peuvent être générés par scission des groupements esters. Cette **hydrolyse partielle** permet d'améliorer la mouillabilité du matériau (Sun and Öneby, 2006). Mais elle risque aussi d'altérer la tenue mécanique du biomatériau, il est donc important de contrôler la durée et la concentration de l'agent d'hydrolyse. Une surface nano-topographique générée par hydrolyse partielle d'une membrane de PCL simple **améliore de façon drastique sa mouillabilité**.

Les méthodes de fonctionnalisation par liaisons chimiques permettent une **incorporation durable du principe actif** au sein du biomatériau. Cependant, ce greffage covalent engendrerait une **modification de la conformation** des facteurs de croissance et donc une **perte d'activité** de ceux-ci vis-à-vis de la cible cellulaire visée. Il existe un dernier type de fonctionnalisation permettant l'incorporation de molécules actives tout en préservant leur activité biologique. Il s'agit d'une méthode de fonctionnalisation par **adsorption physique**.

➤ *Méthode de fonctionnalisation par adsorption alternée de polyélectrolytes*

Cette méthode de fonctionnalisation est une technique souvent utilisée pour la libération de principes actifs. Son principe repose sur les **liaisons de faible énergie** telles que les interactions électrostatiques, hydrophobes, hydrogènes ou de Van der Waals. Le principe actif peut être incorporé de différentes façons : soit par **simple adsorption** mais dans ce cas, le risque que la molécule active se dé-adsorbe très rapidement est important (Mackie, 2003) ; soit en le protégeant à l'intérieur d'un **film nanostructuré** qui lui-même s'adsorbera à la surface du biomatériau.

Une technique de fonctionnalisation de surface qui soulève beaucoup d'intérêt est l'assemblage de **films multicouches de polyélectrolytes** ou « **layer by layer (LBL)** » (Decher, 1997). Cette technique repose sur les interactions de faible énergie telles que les interactions électrostatiques créées entre deux polymères de charges opposées (**Figure 9**).

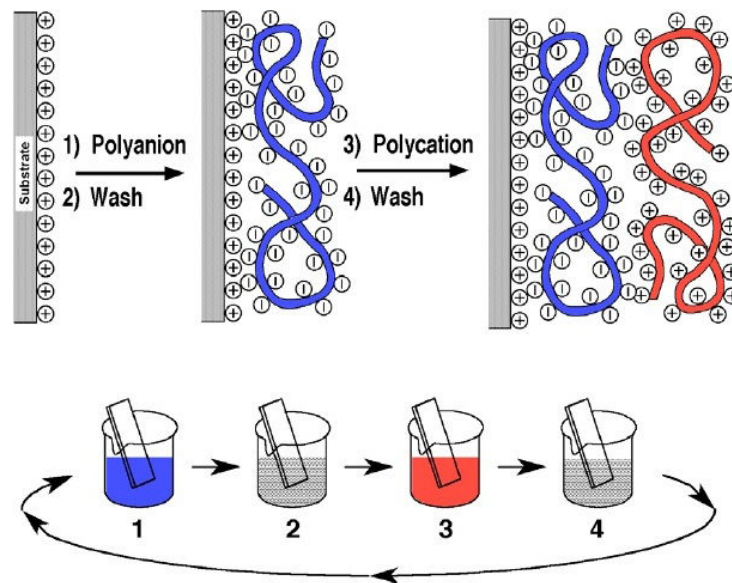


Figure 9: Construction d'un film multicouche de polyélectrolyte (LBL) par trempages successifs alternés de polyanion (bleu) et de polycation (rouge). (Decher, 1997)

Le principe est le suivant (Decher, 1997) : un **substrat chargé positivement** est mis en contact avec une solution de **polyanions** pendant quelques minute (**Figure 9.1**) pour que ceux-ci s'adsorbent à la surface du substrat. Une étape de **rinçage** (**Figure 9.2**) permet ensuite l'élimination du surplus de polyanions qui n'a pas été adsorbé. A la suite du rinçage, la **surface du substrat est chargée négativement** en raison d'une surcompensation de charges lors de l'adsorption. Une solution de **polycations** est alors à son tour mise en contact (**Figure 9.3**) avec le substrat chargé négativement. Les polycations s'adsorbent sur la couche anionique préalablement formée. De même, après rinçage du surplus de polycations (**Figure 9.4**), la **charge en surface du substrat devient positive**. Ainsi, une **bicouche de polyanion/polycation** a été construite. La construction du film de multicouche se réalise par **couches successives** de polycations et de polyanions s'adsorbant par interactions électrostatiques. Le principe de la croissance des films multicouches repose sur la surcompensation des charges qui permet leur inversion au fur et à mesure de chaque dépôt de polyélectrolytes. Par ailleurs, d'autres forces que

les forces électrostatiques telles que les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes (McKee et al., 1992 ; Hammond, 1999; Kotov, 1999;) peuvent également intervenir.

Grâce au principe de construction du film multicouche, une **molécule active peut être incorporée** au sein de celui-ci durant sa construction ou bien par la suite. Il est même possible d'utiliser le principe actif comme **composant d'assemblage** du film. La technique des films de multicouches de polyélectrolytes est donc une des techniques les mieux adaptées à la **fonctionnalisation de structures électrospinnées**, c'est pourquoi nous l'avons choisie afin de fonctionnaliser nos implants dans une optique d'application dans le domaine de la **chirurgie maxillo-faciale** et éventuellement de la chirurgie orthopédique. En effet, les biomatériaux actifs visent principalement la chirurgie maxillo-faciale ainsi que les applications liées aux **maladies parodontales**.

Mise à part l'utilisation de molécules actives et de composés ostéoconducteurs afin de rendre le biomatériau actif, il est important de mentionner la troisième génération de biomatériaux : les **biomatériaux vivants**. En effet, l'utilisation de **cellules autologues** prélevées chez le patient et combinées à un biomatériau est également une stratégie présentant un grand intérêt pour la médecine régénérative de demain.

1.3.3. Les biomatériaux vivants et thérapie cellulaire

La dernière génération de biomatériaux développée récemment a pour but d'engendrer une **réponse biologique** au sein même de l'implant. Dans une optique de **thérapie cellulaire**, les cellules sont prélevées puis **cultivées *in vitro*** afin d'en augmenter le nombre. Elles sont ainsi cultivées deux à trois semaines avant d'être utilisées en combinaison avec un support biodégradable pouvant favoriser la croissance tissulaire (Hench and Polak, 2002). Le biomatériau doté de cellules, dit « **vivant** », est alors implanté au niveau de la lésion osseuse, puis il se dégradera durant la régénération du tissu osseux.

Dans le cas de telles thérapies tissulaires, les cellules peuvent provenir de différentes sources. Elles peuvent être prélevées chez le patient lui-même (**cellules autologues**), ou bien provenir d'un donneur (**cellules allogéniques**), ou encore d'une autre espèce (**cellules xénogéniques**).

Le premier choix, quant à l'origine cellulaire, s'est porté sur les **cellules autologues**. En effet, les cellules autologues sont aujourd'hui le **choix le plus sûr** concernant les risques infectieux et immunitaires en comparaison des thérapies xénogéniques et allogéniques. Il faut cependant que la source cellulaire autologue suffise et produise assez de cellules afin que la thérapie soit un succès. Ceci constitue parfois une limite chez les patients d'un certain âge par exemple.

Les deux types cellulaires utilisés dans ce cadre sont les cellules déjà différenciées (**ostéoblastes**) ou les **cellules souches mesenchymateuses (CSMs)**. D'autres types de cellules souches existent et ont également été étudiées notamment les **cellules souches embryonnaires (CSEs)** ou encore les **cellules pluripotentes induites** ou **cellules iPS** découvertes par Shinya Yamanaka en 2006 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les CSEs proviennent de l'embryon humain aux tous premiers stades de son développement. Elles sont dites « **pluripotentes** » ce qui signifie qu'elles sont capables de proliférer indéfiniment (auto-renouvellement) et de se différencier en cellules de n'importe quel tissu de l'organisme (plus de 200 tissus différents) (Thomson et al., 1998 ; Efthymiou et al., 2014;). De grands espoirs quant à l'utilisation de ces cellules pour des applications biomédicales ont émergés. Cependant, de nombreux **obstacles éthiques** ainsi que **législatifs** ont été soulevés concernant l'utilisation des CSEs. En effet, la législation dans de nombreux pays interdit l'accès aux cellules d'embryons humains dits « surnuméraires », provenant de la fécondation *in vitro* et voués à la destruction. En France, les premières autorisations et dérogations nécessaires à la recherche sur les CSEs n'ont été accordées qu'en 2004, grâce à la **loi de bioéthique** votée la même année encadrant les recherches menées sur les CSEs (Loi N°2004-800 relative à la bioéthique). Et il reste encore un long chemin à parcourir avant que l'utilisation de telles cellules puisse être autorisée en clinique.

Par ailleurs, les **cellules iPS** ont également suscité un vif engouement lors de leur découverte en 2006. En effet, le principe consiste à **reprogrammer génétiquement** des cellules adultes déjà différenciées afin de les rendre pluripotentes semblables à des cellules souches

embryonnaires (Takahashi and Yamanaka, 2006). Le potentiel de ces cellules pour des applications biomédicales est énorme : facilité d'accès, quantité illimitée disponible, pluripotence. Cependant, des recherches plus poussées sur ces cellules ont mis en évidence certains problèmes compromettant leur utilisation possible en clinique. En effet, des problèmes liés à la reprogrammation des cellules et pouvant **engendrer des mutations** ont été mis en évidence (Gore et al., 2011; Hayden, 2011; Laurent et al., 2011), d'autres études ont également montré une possible **réaction immunitaire** causée par les cellules iPS (Hayden, 2011; Zhao et al., 2011). Ainsi, un frein évident a été posé à l'utilisation des cellules iPS en clinique. C'est pourquoi les cellules déjà différenciées (ostéoblastes) et les CSMs autologues sont aujourd'hui les seules cellules autorisées en clinique. Et malgré des capacités de différenciation et de prolifération diminuées par rapport aux CSEs, les CSMs restent une solution très intéressante pour les applications biomédicales.

En effet, depuis les années 1960, grâce à Friedenstein et collaborateurs, les propriétés extrêmement intéressantes des cellules souches mésenchymateuses sont bien connues (Friedenstein et al., 1966; Friedenstein et al., 1968). Ces cellules sont **multipotentes**, sous l'influence de leur environnement et/ou de facteurs de croissance, elles sont capables de se différencier en **cellules spécialisées de tissus mésenchymateux** (Berthiaume et al., 2011). Il est ainsi possible de les utiliser en **ingénierie tissulaire à visée cartilagineuse ou osseuse**.

De nombreux travaux de recherche concernent l'utilisation de cellules souches à des fins d'ingénierie tissulaire ont été et sont toujours menés aujourd'hui (Bianco and Robey, 2001; Mansbridge, 2009 ; Berthiaume et al., 2011;). Les CSMs sont aujourd'hui connues pour être des **précurseurs de cellules ostéoprogénitrices**. Ces cellules jouent un rôle prépondérant pour la thérapie cellulaire. En effet, leur production peut être effectuée de manière sûre et contrôlée à des fins cliniques. Des protocoles ont été mis au point afin de produire des CSMs en grand nombre tout en respectant les normes de sécurité et de qualité requises pour une utilisation en clinique (Sensebe et al., 2011).

En fonction des éléments inducteurs de leur environnement, les CSMs sont capables de se différencier en **cellules osseuses (osteoblastes)**, **cartilagineuses (chondrocytes)**, ou en cellules adipeuses (adipocytes) (Pittenger et al., 1999). Ces cellules ont tout d'abord été identifiées dans la **moelle osseuse** (Pittenger et al., 1999), puis dans le **tissu adipeux** (Zuk et al., 2001), dans le **cordon ombilical** (El Omar et al., 2014), le **placenta** (Yen et al., 2005), le **périoste**, mais

également dans d'autres tissus tels que la **gelée de Wharton** (Margossian et al., 2012; El Omar et al., 2014; Reppel et al., 2014). Des recherches continuent d'être menées concernant les différentes sources possibles de CSMs. Selon les sources, les CSMs présentent un phénotype similaire mais leurs propriétés diffèrent quant à la différenciation et la prolifération cellulaire.

Une caractéristique très intéressante des CSMs est à mentionner : ces cellules **ne sont pas immunogènes** (Krampera et al., 2003; Rosset et al., 2014). Elles présentent même des **propriétés immuno-suppressives** liées à leur capacité à inhiber la prolifération de cellules T et la lyse des cellules NK lors d'utilisation de source allogénique (Krampera et al., 2003; Klyushnenkova et al., 2005; Spaggiari et al., 2006; Uccelli et al., 2007 ; Rosset et al., 2014). Cette propriété inhérente aux CSMs pourraient permettre la thérapie cellulaire allogénique par transplantation de cellules provenant d'une banque universelle de CSMs.

Ces cellules peuvent provenir du périoste, de la moelle osseuse mais également des tissus mous environnants. La **moelle osseuse** est la source la plus utilisée et la plus abondante de CSMs pour une application de réparation osseuse. En effet, les CSMs provenant de la moelle présentent des propriétés de prolifération et de différenciation très importantes (Caplan and Haynesworth, 1993). Ces cellules sont également préférées pour des **aspects pratiques**, les cellules de la moelle osseuse étant facilement accessibles par une procédure simple d'aspiration. En comparaison, les interventions nécessaires à la collecte de CSMs par biopsies de calvaria, de périoste ou d'os spongieux sont beaucoup plus invasives.

Différentes stratégies de thérapies cellulaires ont été développées par **injection directe** ou après culture cellulaire, ou encore en ajoutant les cellules à un support. Ces stratégies sont surtout utilisées dans le cadre **d'interventions chirurgicales orthopédiques** qui sont une des deux principales applications nous préoccupant, l'autre étant le domaine de la chirurgie maxillo-faciale.

2. Pathologies osseuses en Orthopédie : application 1

Nous ne parlerons pas ici des maladies constitutionnelles osseuses qui se rapportent à des anomalies génétiques liées à la formation osseuse. Ces maladies sont présentes dès le début de la vie embryonnaire et d'ordre génétiques. Nous allons décrire principalement l'ostéoporose très souvent liée aux traumatismes osseux tels que les fractures, et la pseudarthrose qui sont des pathologies assez fréquentes en orthopédie. Ce genre de pathologies peuvent en effet être traitées par ingénierie tissulaire et constituent une des applications principales de notre technologie pour la médecine régénérative de demain

2.1. Pathologies osseuses

2.1.1. Ostéoporose

Aujourd'hui, on estime à plus de 200 millions le nombre de personnes atteintes d'ostéoporose dans le monde (Cooper et al., 1992). L'ostéoporose est une maladie fréquente tout particulièrement chez la femme après la ménopause et chez les personnes âgées. Elle concerne environ 40 % des femmes ménopausées et 15 à 30 % des hommes après cinquante ans (Randell et al., 1995). En raison de la population vieillissante, cette maladie pose de plus en plus un problème au niveau de la santé publique.

D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), « l'ostéoporose est une maladie généralisée du squelette, caractérisée par une **densité osseuse basse** et des **altérations de la microarchitecture osseuse** ». Cette maladie entraîne une **fragilisation du squelette** pouvant provoquer des fractures à l'occasion de traumatismes censés être de faible importance. Elle est même parfois la cause de **fractures spontanées**. La résistance de l'os aux traumatismes et aux fractures ainsi que sa qualité dépend de différents facteurs. Des facteurs tels que la masse osseuse, la micro-architecture de l'os, ou encore des facteurs provenant des composants de l'os

lui-même comme la **qualité du collagène**, le **degré de minéralisation**, et le remodelage osseux sont des facteurs pouvant intervenir dans la qualité de l'os et influencer sur sa capacité de résistance aux fractures. En effet, le remodelage osseux et plus particulièrement **l'équilibre entre formation et résorption osseuse** sont nécessaires au maintien d'un os sain. Le remodelage osseux permet entre autre le renouvellement de l'os ancien s'étant accumulé et ayant perdu de sa résistance. Lorsque l'équilibre du remodelage osseux est perturbé et que le taux de résorption osseuse devient plus important que le taux de formation osseuse, de la **perte de masse osseuse** a lieu et peut altérer la qualité de l'os et finalement fragiliser dramatiquement la structure osseuse. En particulier lorsque ces altérations touchent la micro-architecture de l'os trabéculaire. En effet, les fractures dues à l'ostéoporose concernent principalement des zones du squelette riche en os trabéculaire telles que les vertèbres, les poignets et le fémur. L'os trabéculaire sain présente une structure composée de faisceaux larges, plats et interconnectés formant un réseau solide et résistant. En comparaison, chez les sujets atteints d'ostéoporose, ces faisceaux sont dégradés en tiges fragiles déconnectées les unes des autres ne formant plus qu'une structure fragilisée et susceptible d'être endommagée au moindre choc (**Figure 10**) (Dempster, 2011).

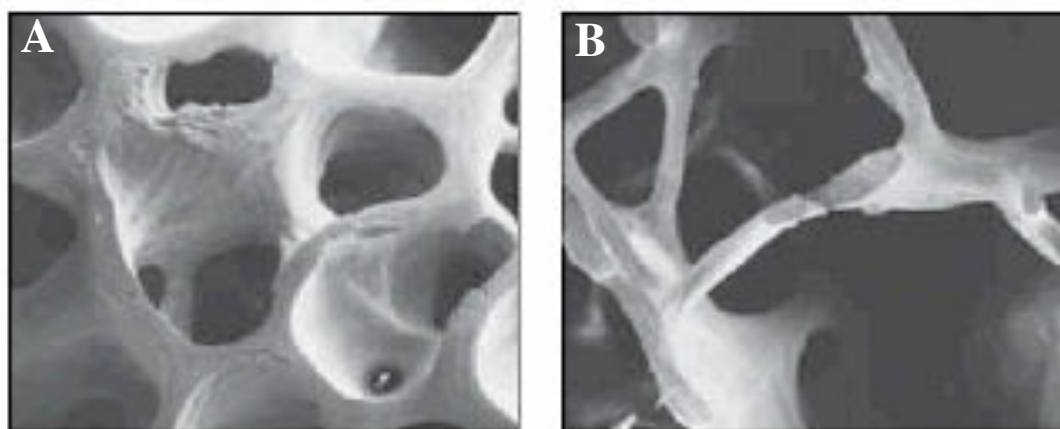


Figure 10 : Comparaison d'un os trabéculaire sain (A) et d'un os trabéculaire ostéoporeux (B) au MEB (Dempster, 2011)

Ainsi, les risques de fractures sont démultipliés chez les sujets atteints d'ostéoporose. En effet, l'estimation du nombre annuel de fractures du poignet est d'environ 35 000, des vertèbres environ 50 000 à 75 000, et du col du fémur environ 50 000. Il est à noter que le risque de mortalité augmente de 10 % à 20 % dans l'année suivant une fracture du fémur et une perte

d'autonomie est observée dans 3 % des cas. Les fractures ostéoporotiques, particulièrement les fractures de l'extrémité supérieure du fémur, altèrent la qualité de la vie et accroissent le risque de morbidité et de mortalité. En tenant compte du vieillissement de la population française, le nombre de fractures du fémur devrait tripler d'ici 2050. D'autres fractures ostéoporotiques peuvent également survenir telles que des fractures du crâne, des doigts, des orteils, de l'humérus, etc.

Il est estimé que chaque année, en France, environ 21 000 à 23 000 hospitalisations sont dues à des fractures ostéoporotiques. En terme de conséquences économiques, le coût français des séjours hospitaliers dus à une fracture ostéoporotique est estimé à environ **300 millions d'euros** pour les hommes et **610 millions d'euros** pour les femmes. De plus, au niveau européen, le coût direct hospitalier de l'ostéoporose était estimé à **31,7 milliards d'euros** en 2000, et serait évalué à 76 milliards d'euros en 2050 au vu de l'évolution démographique prévue pour les trente prochaines années (Compston et al., 1998; Maravic et al., 2005; Mirman, 2012). Par ailleurs, en 2005, aux Etats-Unis, ce même coût était estimé entre 13,7 et 20,3 milliards de dollars (Burge et al., 2007). Ces chiffres n'ont cessé d'augmenter durant ces quinze dernières années, ils montrent le besoin toujours plus important en terme de technologies nécessaires et requises pour les soins et l'amélioration de la qualité de vie de notre population vieillissante.

2.1.2. Fractures

Une fracture est une rupture de la continuité de l'os, il peut s'agir d'une simple fissure ou bien aller jusqu'à la fracture ouverte. Quelque soit l'origine, accidentelle, due à l'ostéoporose, ou encore due à une hyperactivité sportive, les fractures se comptent par milliers chaque année. Les études montrent qu'en tenant compte du nombre de la population vieillissante en augmentation et du risque de fractures augmentant avec l'âge de façon exponentielle, le nombre de fractures de la hanche dans l'Union Européenne a été estimé passant de 414 000 à 972 000 par an dans les cinquante prochaines années. Quant au nombre de fractures vertébrales, une augmentation de 23,7 millions en 2000 à 37,3 millions en 2050 a été prévue (Curran et al., 2010).

Il est possible de répertorier une dizaine de type de fractures différentes. Nous ne citerons ici que les plus courantes. On peut mentionner en exemple la **fracture du col du fémur** survenant souvent chez les personnes âgées et due à l'action combinée de l'ostéoporose et d'une banale chute de leur hauteur. Chez les jeunes gens au contraire, la fracture du fémur est plutôt localisée au niveau de la diaphyse et souvent causée par des accidents de haute énergie (accidents de sport, vélo, voie publique, etc.). On peut également citer les fractures du tibia et du péroné, et les fractures des métatarsiens au niveau du pied pour la partie inférieure du corps. Concernant la partie supérieure du corps, on peut citer la fracture de Pouteau-Colles qui est la plus fréquente des fractures du poignet et souvent liée à une chute sur la main. Les fractures du coude, ou encore les fractures de la main notamment celles du cinquième métacarpe sont également fréquentes.

L'os étant un tissu capable de se régénérer seul jusqu'à un certain point, à la suite d'une fracture, **un cal osseux** se forme débutant la consolidation qui aboutira par la suite à la cicatrisation osseuse (Marsell and Einhorn, 2011). La consolidation des fractures débute par la **formation d'un hématome** à partir de néo-vaisseaux provenant des tissus sains environnant (**Figure 11 A, 3**). Cet hématome est ensuite remplacé par un **tissu fibroblastique** très richement vascularisé. Ce tissu fibreux ainsi formé assure une certaine stabilité du foyer de fracture, puis des dépôts de sels minéraux vont survenir et un **cal ostéocartilagineux** va apparaître (**Figure 11 B, 4**). Celui-ci sera progressivement colonisé par les cellules ostéoblastiques qui vont construire le **cal osseux**, le modeler afin de former une jonction efficace entre les deux fragments de fracture (**Figure 11 C, 5**). Le tissu osseux continuera à se remodeler durant de nombreux mois après la consolidation en s'adaptant aux contraintes mécaniques (**Figure 11 D, 6**). Afin de stabiliser la fracture et de favoriser le phénomène de consolidation qui peut durer de 30 à 90 jours (jusqu'à 120 jours dans certains cas) selon la localisation et la gravité de la fracture, il est nécessaire d'immobiliser le membre endommagé pour une durée de 3 à 8 semaines (Marsell and Einhorn, 2011). Enfin pour certaines fractures, en plus de l'immobilisation, des **chirurgies de réparation** sont nécessaires comme pour les fractures du fémur ou du tibia. Elles nécessitent parfois même l'utilisation de différents systèmes d'ostéosynthèse tels que les clous centro-medullaire, les plaques et vis, ou encore des broches de Métaizeau.

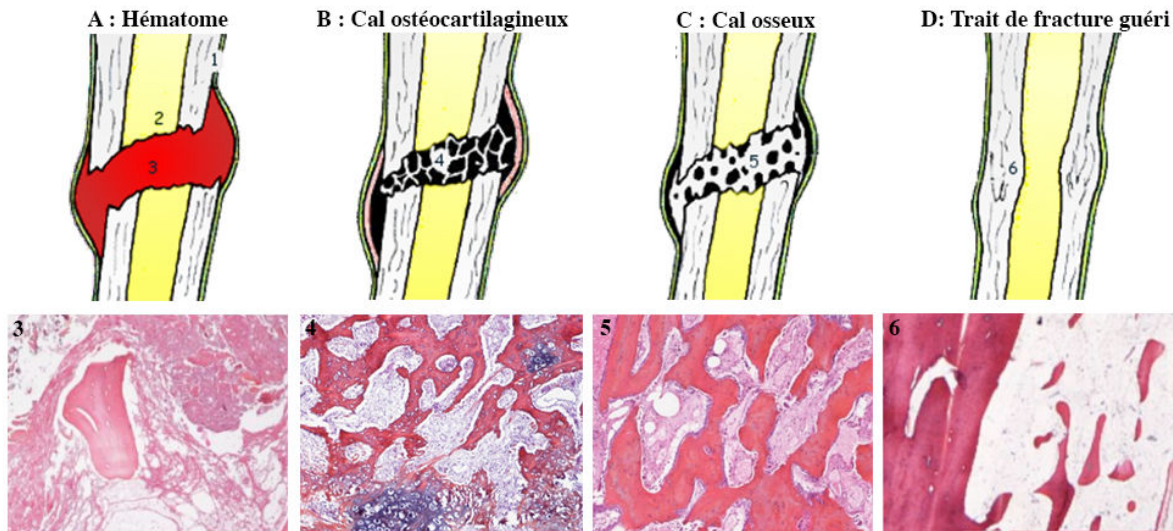


Figure 11: Processus de consolidation d'une fracture osseuse. (1) Périoste, (2) Canal médullaire (Chiron P, 2013)

2.2. Pseudarthrose ou fracture non-consolidée

La pseudarthrose est un phénomène résultant de la non consolidation de deux fragments osseux issus d'une fracture. Il existe différents types de pseudarthroses:

- la pseudarthrose atrophique est caractérisée par l'absence de formation d'un cal osseux ;
- la pseudarthrose hypertrophique est due à la formation d'un cal osseux déficient ;
- la pseudarthrose septique correspond à une pseudarthrose accompagnée une infection osseuse faisant suite à une fracture ouverte ;
- la pseudarthrose aseptique est non infectée mais fait suite à une intervention chirurgicale nécessitant une ouverture large du foyer de fracture et entraînant un décollement du périoste.

La cicatrisation de l'os ne peut avoir lieu que si certaines conditions sont réunies telles que la bonne **vascularisation du foyer de fracture** mais aussi sa **stabilité** et une **oxygénation** suffisante. L'apport des minéraux et de l'oxygène, indispensables à l'ostéogénèse, se fait par la vascularisation du foyer de fracture (Pountos et al., 2014). La **teneur en oxygène** influe directement sur la différenciation des cellules souches (ces cellules se différencient en

chondroblastes et non en ostéoblastes si la teneur en oxygène est trop basse) (Rahn, 1982 ; Hak et al., 2014). Ainsi, un **déficit vasculaire** peut être à l'origine d'un défaut de cicatrisation et conduire à une **pseudarthrose**. De même, si dans certains cas la stabilité du foyer de fracture n'est assurée, la cicatrisation peut être compromise (Prieur and Sumner-Smith, 1984 ; Hankenson et al., 2014). En effet, une **instabilité au niveau du foyer de fracture** due à des mouvements interfragmentaires peut entraîner la formation d'un cal dont la tenue mécanique est faible et défavorable à la cicatrisation. Cela peut également avoir lieu dans le cas d'un éloignement entre les fragments de fractures s'il y a perte de substance osseuse (Salai et al., 1996 ; Hak et al., 2014), interposition de tissu mou entre les abouts ou encore si le système de contention de la fracture n'assure pas un bon affrontement des surfaces fracturées (Woodard and Riser, 1991).

La **tenue mécanique du cal** est un paramètre important de la bonne cicatrisation osseuse car plus la tenue mécanique du cal est faible et plus les micro-mouvements responsables de la rupture de néovaisseaux qui pontent le foyer de fracture, seront importants. Dans le cas de la formation d'un fibrocartilage en lieu et place du cal osseux, ce fibrocartilage peu résistant favorisera l'instabilité et l'incompétence mécanique conduisant ainsi à une pseudarthrose (Rahn, 1982 ; Bottlang et al., 2010; Hak et al., 2014).

D'autre part, des études menées sur différentes espèces ont déterminé la **distance critique** à partir de laquelle la cicatrisation osseuse des deux abouts diaphysaires devient impossible (Hollinger and Kleinschmidt, 1990; Volpon, 1994 ; Mathon et al., 1998; Delgado-Ruiz et al., 2014; Verstraete et al., 2014). Cette distance a été évaluée à **1,4 fois le diamètre diaphysaire moyen** de l'os considéré. Une taille de lésion dépassant cette distance entraîne alors un défaut de progression de la vascularisation et compromet la cicatrisation du foyer de fracture conduisant également à la formation d'une pseudarthrose.

2.3. Les traitements actuels

De nombreux substituts osseux existent aujourd'hui et peuvent être utilisés en clinique. La plupart des produits commercialisés aujourd'hui sont **d'origine animale** ou **humaine** (dérivé de produits cadavériques) (Develioglou et al., 2009; Dimitriou et al., 2011; Oryan et al., 2014). Sous forme de **gels** ou de **granulés**, les substituts utilisés pour le comblement osseux sont souvent composés **d'hydroxyapatite dérivée de coraux**, de **phosphate tricalcique** (β -TCP), ou encore de **matrice osseuse déminéralisée** en mélange avec différentes substances. Nous ne nous intéresserons pas plus en détails aux substituts osseux qui ne font pas l'objet de cette thèse. En effet, l'application des biomatériaux qui nous intéressent ici vise principalement les membranes implantables, utilisées en clinique et capables de régénérer le tissu osseux au niveau de lésions de faible taille.

Ceci concerne principalement des membranes résorbables de collagène. On peut citer le produit **BioVERSE™** (Stryker/ Olympus Biotech, USA) qui est un dérivé de tissus osseux cadavériques humains décellularisés et déminéralisés. Le produit est présenté sous la forme d'une éponge compressible et implantable (**Figure 12**).



Figure 12: BioVERSE™ éponge de collagène allogénique commercialisée par Stryker/Olympus Biotech (Internet: Olympus Biotech)

La **membrane Bio-Gide®** commercialisée par Geistlich est constituée de collagène de type I d'origine bovine (Kozlovsky et al., 2009). Cette membrane est principalement utilisée dans le domaine de la **régénération osseuse guidée maxillo-faciale**, nous détaillerons donc ses caractéristiques dans les paragraphes suivants.

Citons également le produit **INFUSE® Bone graft** qui est constitué d'une membrane de collagène imbibée de facteur de croissance rhBMP-2 (human recombinant Bone Morphogenetic Protein 2). L'utilisation de facteur de croissance telle que la BMP-2 vise à améliorer les propriétés d'ostéoconduction et ostéoinduction du support collagénique. Cependant, le kit commercialisé fournit jusqu'à **12 mg** de BMP-2, l'utilisation d'une telle quantité entraîne des **risques d'ostéolyses** mais aussi des risques de **métastases osseuses** à la suite d'une résection osseuse sur un site cancéreux (Zara et al., 2011 ; Tannoury and An, 2014). D'autre part, la membrane de collagène n'étant qu'imbibée brièvement, une **libération rapide et non contrôlé** de la BMP-2 a lieu. Cette **libération passive** et presque instantanée ne permet pas une action progressive et continue du facteur de croissance sur le processus de régénération osseuse au niveau du site d'implantation (Tannoury and An, 2014). L'action et les avantages des facteurs de croissance seront décrits en détails par la suite.

Il est également nécessaire de citer deux produits commercialisés par Stryker/Olympus Biotech : **OP-1® Implant** et **OP-1® Putty** (Oryan et al., 2014) (**Figure 13**). Les deux produits sont constitués de rhBMP-7 lyophilisé accompagné de collagène de type 1 sous forme de poudre. Bien que le collagène ne se présente pas sous forme de membrane, l'utilisation de la BMP-7 limite la quantité de collagène utilisé lors de l'intervention chirurgicale et limite la taille des lésions osseuses pouvant être traitées grâce à ces produits. Les deux produits requièrent l'utilisation du sérum physiologique avant application.



Figure 13: OP-1® Putty et OP-1® Implant commercialisés par Stryker/Olympus Biotech (Internet: Olympus Biotech)

Dans le domaine de la régénération osseuse, de nombreux produits ont été développés pour le comblement osseux de lésions de taille intermédiaire. Cependant, le choix concernant les

membranes commercialisées pour la nanomédecine régénérative est bien plus limité et presque exclusivement **d'origine allogénique** ou **xénogénique**. Et bien que l'**efficacité** de ces membranes ne soit plus à prouver en terme de **biocompatibilité** et **d'intégration tissulaire**, les **risques de transmission de maladies** ou de prion bovin restent présents. Des **problèmes éthiques** peuvent également se poser quant à l'origine des ces membranes (dérivé de cadavres par exemple). D'autre part, certaines croyances religieuses pourraient limiter leur utilisation et rendre leur accès impossible à une partie des patients. Enfin, des limites en terme de coûts économiques doivent également être mentionnées. En effet, un investissement économique doit être fait dans le traitement des membranes et les processus de contrôle-qualité. Ceci afin d'assurer la **sécurité** et la **qualité** des produits d'origine allogénique ou xénogénique. Cela entraîne une répercussion des coûts sur le prix final très important des produits commercialisés. Pour toutes ces raisons, des recherches sont encore menées afin de développer une technologie **alternative synthétique** aux membranes de collagène aujourd'hui utilisées en clinique.

2.4. Les traitements prometteurs

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les **biomatériaux vivants** sont l'apanage des chirurgies orthopédiques. Différentes stratégies de **thérapies cellulaires** ont été développées afin de pouvoir utiliser les cellules prélevées directement chez le patient par injection directe ou après culture cellulaire, ou encore en **combinant les cellules à un biomatériau**, le rendant ainsi « vivant ». Les cellules sont aspirées de la moelle osseuse et peuvent ensuite être centrifugées afin d'en augmenter la concentration (Hernigou et al., 2006). Elles sont ensuite directement **injectées au niveau de la lésion osseuse**, ou bien **combinées à un support ostéoconducteur** naturel ou synthétique avant implantation. Des études cliniques menées sur différentes cohortes de patients atteints de pseudarthrose ont montré que la vitesse de guérison était directement liée à la concentration de CSMs injectées (Hernigou and Beaujean, 1997; Hernigou et al., 2005; Mathieu et al., 2013). En effet, plus la concentration en CSMs augmente et plus la régénération osseuse est rapide.

Une autre stratégie consiste à **cultiver *in vitro*** les cellules prélevées, cette étape permet la **sélection** et la **prolifération** des CSMs. Des millions de CSMs peuvent alors être produites tandis que seules quelques dizaines de milliers de cellules sont disponibles directement après le prélèvement. Les CSMs peuvent également être ensemencées sur une membrane pendant un certain temps afin d'optimiser la colonisation et la différenciation cellulaires de la membrane *ex vivo* (Rosset et al., 2014). Une autre solution envisageable est d'implanter en premier lieu le biomatériau vivant dans un muscle pendant quelques semaines afin de favoriser l'angiogenèse et la vascularisation du biomatériau (Warnke et al., 2006). Une fois ceci effectué, le biomatériau vivant est alors prêt à être implanté au niveau de la lésion.

Les biomatériaux que nous avons décrits précédemment, approuvés par les autorités compétentes (FDA, marquage CE) et déjà utilisés en clinique peuvent être utilisés en combinaison avec les cellules sous un protocole normé et approuvé (Sensebe et al., 2011). Cependant, les biomatériaux les plus communément utilisés pour cette application sont les matériaux de comblement osseux tels que les granulés de β -TCP. Les membranes de collagène associées aux cellules sont plus rarement utilisées en clinique. Toutefois, une technique intéressante et développée par **Masquelet** (Giannoudis et al., 2011), associe lors de l'intervention chirurgicale le **comblement osseux** et une **membrane biorésorbable** dans le but de régénérer des lésions de grandes tailles. De plus, quelle que soit la nature du biomatériau (comblement osseux ou membrane biorésorbable), celui-ci a pour but de favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation des CSMs. Il doit également favoriser la synthèse de matrice collagénique tout en permettant une bonne vascularisation de l'implant.

Aujourd'hui, seules les **cellules autologues** sont autorisées et utilisées en clinique pour la thérapie cellulaire. Au sein du bloc opératoire, le chirurgien est seul responsable de la manipulation des cellules et de leur devenir. Lorsque les cellules sont amenées à être transportées dans différents lieux, ceux-ci doivent être accrédités par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) (Rosset et al., 2014). Concernant la culture des CSMs dans un but de thérapie cellulaire chez l'Homme, la pratique est classée comme « **produit médical avancé** » par la Commission Européenne 1394/2007 et ne peut être réalisée qu'en des espaces dédiés et respectant les règles GMP (Good Manufacturing Practices) (Sensebe et al., 2011). En France, une accréditation doit être également délivrée par l'ANSM. Toutes ces normes

et ces contrôles doivent assurer la sécurité ainsi que la qualité du matériel, des protocoles et des pratiques mis en œuvre lors de la manipulation des cellules.

Le développement des biomatériaux et la conception de nouvelles stratégies de thérapie cellulaire sont un grand espoir pour le traitement de tout type de lésion osseuse. Il est toutefois important de souligner que cette stratégie combinant biomatériau et thérapie cellulaire se distingue de la **régénération tissulaire guidée**. En effet, la régénération tissulaire et plus particulièrement la **régénération osseuse guidée** se basent uniquement sur le recrutement cellulaire par le biais du support implanté au niveau de la lésion osseuse. Ce concept est plus souvent utilisé dans le domaine de la chirurgie maxillo-faciale et des maladies parodontales que nous allons maintenant présenter.

3. Pathologies osseuses en Chirurgie Maxillo-Faciale et en Parodontologie : applications 2

Les pertes osseuses maxillo-faciales peuvent être d'origines multiples. La résection de kystes, ou de tumeurs osseuses, ou encore l'ostéonécrose et les maladies parodontales peuvent en être la cause. Dans cette partie, nous décrirons ces pathologies, à l'origine de pertes osseuses maxillo-faciales, qui font partie du domaine d'application de notre technologie. Nous présenterons également les solutions cliniques existantes et les pistes de recherche possibles pour des applications cliniques.

3.1. Pertes osseuses

3.1.1. Pertes osseuses en chirurgie maxillo-faciale

➤ *Résections kystiques*

Les **tumeurs osseuses** et les **kystes osseux** de la face, principalement des maxillaires, sont très fréquents (Stomatologie, 2011). L'intégralité des lésions tumorales bénignes et malignes d'origine osseuse, comparables à celles des autres os de l'organisme (notamment les os longs), peuvent y être retrouvée. De plus, des lésions plus spécifiques (kystiques) peuvent être d'origine dentaire ce qui confèrent à cette région du corps une véritable spécificité pathologique (Wilk, 2008).

Par définition, les kystes sont des **cavités intra-osseuses** dont la paroi est revêtue d'épithélium et dont le contenu est sécrété par le tissu de revêtement. Les kystes peuvent être distingués selon leur origine dentaire ou non dentaire. Parmi les **kystes d'origine non dentaire**, il existe les kystes fissuraires et les kystes du canal nasopalatin, mais ceux-ci sont plus rares. En revanche, les **kystes d'origine dentaire** sont beaucoup plus fréquents et peuvent être **inflammatoires**, **dentigères**, ou encore **épidermoïdes** (Stomatologie, 2011). Les kystes inflammatoires (kystes radiculodentaire, kyste latéral et kyste résiduel) sont les plus fréquents et

surviennent à l'occasion d'une infection dentaire (nécrose). Les kystes dentigères (ou kystes folliculaires ou péricoronaires ou coronodentaires) sont également très fréquents. Ils se forment à partir du sac dentaire autour de la couronne d'une dent incluse. Ils se développent typiquement sur la dent de sagesse mandibulaire et peuvent s'étendre sur plusieurs centimètres de diamètre. Les kystes épidermoïdes ou kératokystes se développent chez le sujet jeune (10-30 ans) à partir d'ébauches dentaires. (Wilk, 2008 ; Ruhin-Poncet et al., 2011).

Dans tous les cas, le traitement se fait par **ablation chirurgicale** du kyste accompagnée d'un **curetage**. Dans certains cas, l'extraction d'une ou de plusieurs dents est nécessaire et selon la taille du kyste, le volume osseux manquant nécessite l'utilisation de substituts osseux et même parfois une reconstruction osseuse partielle de la mandibule (Cakarar et al., 2011; Ruhin-Poncet et al., 2011 ; Kourkouta and Bailey, 2014). De plus, les risques de récurrences existent et augmentent lorsque plusieurs dents sont concernées lors du traitement du kyste.

➤ *Cancer et résections tumorales*

La distinction classique se fait entre **tumeur bénigne** et **tumeur maligne**. Les tumeurs malignes d'origine dentaire telles que le carcinome ou le sarcome odontogénique, sont exceptionnelles et ne se manifestent que dans des cas très rares (Stomatologie, 2011). D'autre part, les **tumeurs malignes d'origine non dentaire** rencontrées plus fréquemment au niveau maxillo-facial sont les ostéosarcomes, les chondrosarcomes, les fibrosarcomes, les lésions métastatiques, et les carcinomes épidermoïdes. Les carcinomes épidermoïdes sont d'ailleurs à l'origine du plus grand nombre de résection osseuse. Cependant, compte tenu de la gravité de ces pathologies, la **résection tumorale** accompagnée d'une greffe osseuse est souvent **insuffisante** et **nécessite des traitements de chimiothérapie complémentaires** (Stomatologie, 2011). Nous ne nous attarderons pas sur ces pathologies car elles ne concernent pas notre champ d'application.

Les **tumeurs bénignes d'origine dentaire** les plus intéressantes à citer sont les tumeurs épithéliales ou **améloblastomes**. Les améloblastomes sont des tumeurs dérivant des améloblastes (cellules de l'émail) ayant perdu leur capacité à fabriquer de l'émail. Ces tumeurs atteignent la mandibule dans 85% des cas et sont considérées comme des tumeurs bénignes à **malignité locale** (Sasaki et al., 2014). Des pseudopodes tumoraux intra-osseux peuvent s'infiltrer dans les

canaux de Havers et après effraction corticale, l'envahissement des parties molles par la tumeur se fait par invasion. Il est à noter qu'il n'y a jamais de métastase dans les améloblastomes. Cependant, leur développement progressif peut dégénérer en une véritable tumeur maligne : l'épithélioma adamantin qui donne fréquemment des métastases (Nobusawa et al., 2014).

Concernant les **tumeurs bénignes d'origine non dentaire**, il est intéressant de mentionner les **tumeurs osseuses** (ostéome ostéoïde, ostéoblastome, ostéome), les **tumeurs cartilagineuses** (chondrome, ostéochondrome, chondroblastome et fibrome chondromyxoïde), et les **tumeurs conjonctives** (dysplasie fibreuse) (Stomatologie, 2011). Pour exemple, la dysplasie fibreuse présente un tissu osseux entièrement remplacé par de larges plages de tissu fibreux bien vascularisées (Wilk, 2008). Comme pour les kystes, le traitement de ces tumeurs bénignes consiste en une **résection suffisante** de la tumeur mais également de l'os en périphérie. Selon la taille de la tumeur, la résection occasionne souvent l'utilisation de substituts osseux, de greffes osseuses autologues, ou encore de prothèses afin de remplacer le volume osseux manquant.

La fréquence de ces pathologies est tout de même **réduite** en comparaison avec des traumatismes osseux tels que les fractures. En France, durant la période de 2010-2011, seules **1,6 % des hospitalisations** ayant occasionné l'utilisation de substituts osseux dans le secteur public étaient dues à des cancers (HAS, 2013).

➤ *Ostéonécroses*

L'ostéonécrose survient à la suite d'une réduction de l'apport sanguin local (**ischémie**) entraînant alors des lésions osseuses et la nécrose du tissu. Ce genre de lésions peut être localisé au sein de n'importe quel os, mais les maxillaires sont le lieu privilégié de l'ostéonécrose.

Un os sain possède un potentiel d'auto-réparation relativement efficace. En effet, l'os compact, bien vascularisé par les tissus mous environnants, est moins sensible aux conséquences de l'ischémie. En revanche, **l'os spongieux est plus vulnérable** aux effets de possibles infarctus osseux. La vulnérabilité de l'os spongieux face aux défauts vasculaires est due à sa structure en maillage et à ses espaces remplis de moelle. Ainsi, des infarctus osseux au sein de l'os spongieux peuvent conduire à l'anoxie et à l'apoptose prématurée des cellules (Kanus, 1996; Vigorita,

1999). Dans un os sain, les cellules osseuses responsables du maintien du tissu osseux et de son remodelage, sont **constamment renouvelées** grâce à la différenciation des cellules souches provenant de la moelle osseuse (Owen and Friedenstein, 1988). Cependant, lorsque l'os spongieux est atteint d'accidents ischémiques et que la moelle osseuse est endommagée, il y a **altération du potentiel de différenciation** de ses cellules souches combinée avec une mort prématurée des cellules osseuses (Suh et al., 2005 ; Lee et al., 2006b). Le tissu osseux est alors dans l'incapacité de se remodeler ou de s'auto-réparer: il y a ostéonécrose.

Comme mentionné précédemment, les maxillaires sont un des sites privilégiés de cette maladie. Ceci est principalement dû au fait que les **traumatismes et infections** sont les premières causes d'ostéonécrose, or maxillaire et mandibule sont souvent le siège de traumatismes ou d'infections particulièrement importants. Pour ne citer que quelques exemples, nous pouvons mentionner les extractions dentaires, les fractures de la mâchoire, ou encore les nombreuses maladies parodontales. De plus, des événements secondaires tels que l'injection d'anesthésiques locaux, ou de vasoconstricteurs lors d'interventions chirurgicales dentaires peuvent également aggraver ou être une cause de la maladie (Reid, 2009). L'influence des bisphosphonates, utilisés pour le traitement de l'ostéoporose et de certaines métastases osseuses, sur l'ostéonécrose a également été étudié, on parle alors d'**ostéochimionécrose** (Gupta et al., 2013). Une complication sévère et tardive d'une radiothérapie peut également être à l'origine de lésions ostéonécrotiques, il s'agit alors d'**ostéoradionécrose**.

Une ostéonécrose de la mâchoire entraîne une nécrose de l'os ou de la moelle osseuse en raison d'une lente asphyxie et/ou d'un manque de nutriments. Le tissu osseux subissant un déficit chronique d'apport vasculaire réagit par la détérioration de la moelle osseuse à travers le développement d'une moelle fibreuse. En effet, un tissu fibreux survit plus facilement dans des zones privées d'éléments nutritifs, le tissu apparaissant alors pourra être une moelle grasse nécrosée, ou une moelle très sèche, parfois scléreuse, ou encore un espace complètement vide (ostéocavitation). Un infarctus osseux dû à la formation de caillots dans les petits vaisseaux sanguins de l'os spongieux peut également être la cause d'une diminution du flux sanguin et entraîner une ostéonécrose.

D'autre part, l'ostéonécrose peut créer dans la moelle osseuse un **environnement favorable à la croissance bactérienne**. Et les infections dentaires très fréquentes chez les

patients sont une des premières causes de déficit du flux sanguin dans la moelle osseuse. En effet, une infection ou inflammation locale peut augmenter la pression et favoriser la formation de **caillots sanguins** dans la zone concernée. Ceux-ci pourront alors entraîner une ostéonécrose qui à son tour favorisera la multiplication bactérienne.

Il est également à mentionner que la mort de l'os ne modifie pas son opacité sur les radiographies ni sa densité minérale. L'os nécrosé ne subit pas de résorption, par conséquent, il semble relativement plus opaque. Il est donc difficile de détecter toutes anomalies dues à une ostéonécrose par des procédés classiques (radiographie, scintigraphie, ou IRM). Une des rares techniques d'imagerie pouvant procurer des indices sur des changements de la densité osseuse est l'échographie associée à la radiographie panoramique (Imbeau, 2005).

Concernant le traitement de la maladie, des preuves cliniques ont montré que **l'ablation chirurgicale de la moelle endommagée**, le plus souvent par **curetage et décortication** de l'os, permettrait de résoudre le problème (et de supprimer la douleur) pour **74 % des patients** atteints de lésions de la mâchoire (Bouquot and Christian, 1995; Carlson and Basile, 2009; Williamson, 2010 ; Wilde et al., 2011). Cependant, plusieurs chirurgies répétées pourraient être nécessaires puisque l'ostéonécrose présente souvent des lésions multiples au sein du même os ou dans des os similaires. Des recherches sont en cours sur d'autres modalités thérapeutiques non chirurgicales qui peuvent, seules ou en association avec la chirurgie, améliorer le pronostic et réduire la morbidité de l'ostéonécrose (Bocanegra-Perez et al., 2012; Gonzalvez-Garcia et al., 2012; Pal et al., 2012 ; Ohbayashi et al., 2013).

3.1.2. Cas particulier des maladies parodontales

Lorsqu'on parle de maladies au niveau des maxillaires, il est essentiel de mentionner les **maladies parodontales** (parodontopathies) qui regroupent toutes les atteintes du **parodonte**. Celui-ci est constitué des **tissus de soutien de la dent** qui sont la gencive, **l'os alvéolaire**, le ligament alvéolo-dentaire et le cément (**Figure 14**). Le parodonte permet **l'ancrage et le soutien des dents** ainsi que leur **approvisionnement en nutriments**. De plus, il assure la résistance et la dissipation des contraintes liées à la mastication protégeant ainsi la dentition et la mâchoire. Le

cément, tissu avasculaire, non-innervé et minéralisé, recouvre les racines des dents et est lié aux fibres du ligament parodontal. Celui-ci est, entre autres, constitué de fibres de collagène et permet l'absorption et de la redistribution des forces subies par l'organe dentaire vers l'os alvéolaire. D'un côté, le ligament présente une interface avec le cément et de l'autre, l'interface se fait avec l'os alvéolaire (Bercy and Tenenbaum, 1996; Nanci and Bosshardt, 2006). L'ancrage de la dent par la racine au sein de l'os alvéolaire se fait par l'intermédiaire du cément et du ligament. L'os alvéolaire sert de soutien aux dents. Enfin, la gencive, partie visible du parodonte, recouvre l'os alvéolaire et assure une protection étanche des tissus précédemment mentionnés (Bercy and Tenenbaum, 1996).

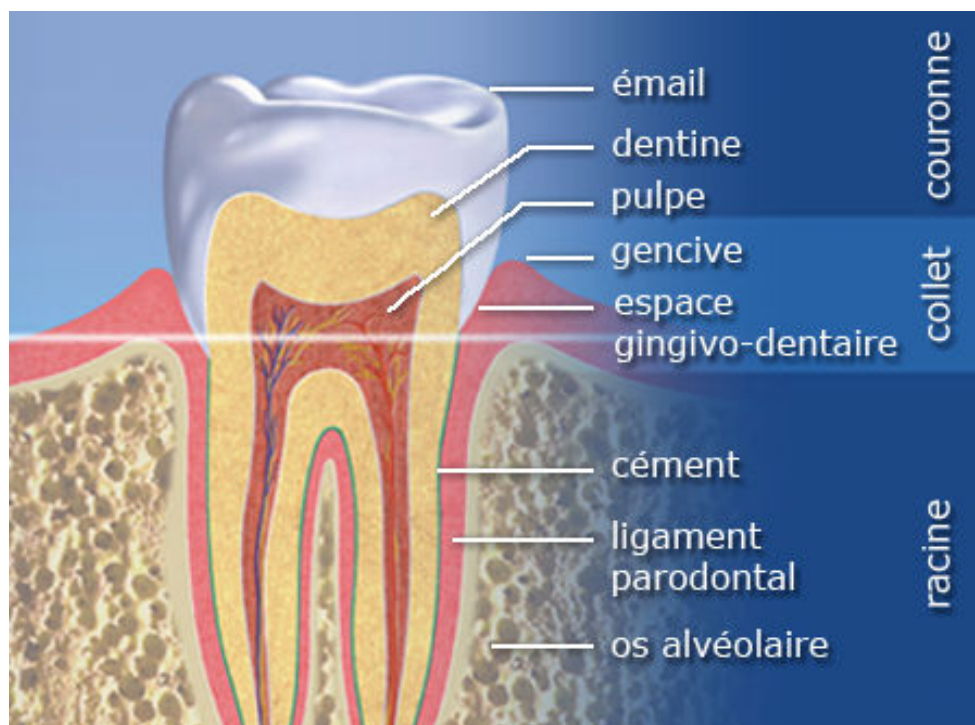


Figure 14: Schéma explicatif de l'organe dentaire et du parodonte (Internet: Khaksar, 2014)

En première approximation, les maladies parodontales sont essentiellement des maladies **d'origine infectieuse**. Elles présentent deux formes distinctes : les **gingivites** qui sont des lésions limitées au rebord gingival, et les **parodontites**, maladies destructrices des tissus de soutien de la dent et que nous détaillerons en raison de leur conséquences graves au niveau des maxillaires. Les gingivites sont des maladies réversibles, provoquées par une accumulation de la plaque bactérienne et pouvant être totalement éliminée grâce à une hygiène adaptée. De plus, aucune poche parodontale (espace créé entre la dent et la gencive) ni de destruction osseuse n'est

constatée. En revanche, les parodontites sont caractérisées par des **pertes d'attache** et **osseuses** bien plus importantes. Sous l'effet de l'inflammation, le parodonte peut être en partie ou entièrement détruit engendrant la destruction partielle ou totale du système d'attache (perte d'attache) (Nanci and Bosshardt, 2006). De plus, en raison de la perte d'attache entraînant le « décollement » de la gencive, des **poches parodontales**, parfaits « nids » à bactéries, peuvent également survenir. L'os alvéolaire, également touché, se détériore provoquant une **destruction osseuse**. Les fibres d'ancrage du ligament alvéolo-dentaire sont lésées et détachées du ciment entraînant éventuellement une mobilité et une perte dentaire. Les parodontites destructrices sont toujours accompagnées de la présence dominante de *Porphyromonas gingivalis* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mais de nombreuses autres espèces sont également observées dans la plaque bactérienne. Les parodontites sont des **maladies multifactorielles** dues à la conjonction de bactéries et d'une **réponse inflammatoire modifiée** (Saadi-Thiers et al., 2013 ; Akcali et al., 2014; Huck et al., 2014). Par ailleurs, des études se sont concentrées sur la mise en évidence d'une corrélation entre les maladies parodontales et certaines maladies systémiques telles que l'athérosclérose, l'ostéoporose ou encore l'arthrite rhumatoïde (Huck et al., 2011; Gumus et al., 2013; Queiroz-Junior et al., 2013). Cependant, aucun indicateur aujourd'hui ne permet de prédire si une gingivite va évoluer en une parodontite ou bien rester stable. En effet, l'environnement spécifique ainsi que des facteurs liés à l'hôte vont déterminer la susceptibilité du sujet à développer une flore bactérienne pathogène, une infection et une réponse inflammatoire destructrice.

On peut classer les maladies parodontales en huit catégories différentes (Wiebe and Putnins, 2000) :

- les gingivites ;
- les parodontites chroniques ;
- les parodontites agressives ;
- les parodontites nécrosantes ;
- les parodontites en relation avec les maladies systémiques ;
- les parodontites associées aux lésions d'origine endodontique ;
- les abcès parodontaux ;
- les parodontites liées à des facteurs aggravants (malposition dentaire, traumatisme occlusal).

Dans cette classification, on peut distinguer les parodontites chroniques et les parodontites agressives (Demmer and Papapanou, 2010). Les parodontites chroniques sont provoquées par une surabondance de plaque bactérienne et présentent un développement lent. Très souvent diagnostiquées tardivement, elles sont rarement la cause de perte dentaire. Les parodontites agressives peuvent au contraire survenir à n'importe quel âge. Elles peuvent être localisées ou généralisées et présentent souvent une perte de support parodontal et osseuse conséquente.

Les dépenses de santé publique concernant les maladies bucco-dentaires se répartissent principalement entre les lésions carieuses et les parodontopathies. En France, **30 à 40 % des extractions dentaires** sont dues aux conséquences des parodontites. Selon une étude épidémiologique, entre 2002 et 2003, 95,4 % des sujets examinés présentaient une perte d'attache et 82,2 % d'entre eux présentaient des poches parodontales (Bourgeois et al., 2007). D'autre part, 46,7 % des sujets examinés présentaient des lésions du parodonte très sévères avec une perte d'attache de plus de 5 mm quand 10,2 % d'entre eux présentaient des poches parodontales de plus de 5 mm de profondeur. Enfin, on estime à 1,1 million le nombre de patients présentant des pertes d'attache d'au moins 7 mm. Les études montrent enfin que les hommes sont plus sujets aux parodontites et que la prévalence des parodontites augmente avec l'âge (Bourgeois et al., 2007; Demmer and Papapanou, 2010).

Aujourd'hui, différentes formes de thérapeutiques existent pour le traitement des maladies parodontales. Elles sont principalement de deux types : les **traitements non chirurgicaux** et les **traitements chirurgicaux**. Ces méthodes thérapeutiques visent à éliminer les niches écologiques de la plaque bactérienne. Les traitements non chirurgicaux consistent à assainir les surfaces dentaires grâce à un détartrage supra- et sous-gingival. Souvent, par la suite, un curetage/surfaçage sous-gingival du versant dentaire des poches parodontales est également effectué. Ces traitements ne rentrent pas dans notre champ d'application. En revanche, concernant les traitements chirurgicaux, de nouvelles orientations ont pour ambition de régénérer les tissus endommagés par les maladies parodontales, mais également dus à d'autres atteintes maxillo-faciales. Les thérapeutiques dites de **régénération tissulaire/osseuse guidée (RTG/ROG)** (Trombelli, 2005 ; Retzepi and Donos, 2010; Bottino et al., 2012) ont tout particulièrement été développées dans ce but.

3.2. Régénération tissulaire ou osseuse guidée

Au début des traitements chirurgicaux, la transplantation de tissus autologues était classiquement utilisée. Cependant, afin de réduire la morbidité et la nécessité d'une deuxième procédure chirurgicale, l'utilisation de membranes dans le cadre de la **régénération tissulaire/osseuse guidée (RTG/ROG)** est devenue de plus en plus populaire. Le concept de la RTG utilise des membranes afin **d'obtenir des gains d'attache et d'empêcher la migration dans la lésion des cellules épithéliales et conjonctives gingivales** pour permettre celle des cellules conjonctives du ligament parodontale, et des cellules osseuses et cémentaires afin de régénérer le parodonte détruit (Behring et al., 2008). D'autre part, la **restauration de sites osseux** alvéolaires déficients dans un but **d'implantologie** est également une application importante de la régénération osseuse guidée (ROG) (Retzepi and Donos, 2010), **l'élévation du sinus maxillaire** dont nous allons décrire les étapes par la suite en est un exemple des plus courants.

La stratégie première était **d'isoler la lésion** grâce à une **barrière physique** afin d'empêcher la migration et la prolifération épithéliale. Ceci a conduit au développement de membranes RTG/ROG. Ces membranes sont de deux types : **résorbables** et **non-résorbables**. En effet, la première génération de membranes était non résorbable et obligeait à une ré-intervention sur les sites traités. Une seconde génération de membranes résorbables a donc été développée (Kasaj et al., 2008). Et lorsque la perte de substance osseuse est trop importante, des greffes osseuses autologues, homologues ou hétérologues peuvent être utilisées conjointement avec les membranes résorbables (McClain and Schallhorn, 2000 ; Gielkens et al., 2008). Ainsi, les défauts osseux et les pertes de substances liées à la maladie parodontale ou d'ordre traumatique ou chirurgical pourraient être palliés grâce à l'utilisation de membranes ou de matériaux bioactifs.

Les membranes résorbables doivent: (i) être biocompatibles afin de permettre leur intégration au sein des tissus du patient sans provoquer de réaction inflammatoire, (ii) présenter une vitesse de dégradation adaptée à la régénération tissulaire, (iii) posséder des propriétés mécaniques adéquates pour la manipulation chirurgicale (Karring, 2000; Taba et al., 2005; Villar and Cochran, 2010 ; Chen and Jin, 2010; Gentile et al., 2011).

➤ *Exemple de la technique de l'élévation du sinus maxillaire*

Concernant les pertes osseuses au niveau maxillo-facial, un exemple courant d'application chirurgicale est à mentionner : l'élévation du sinus maxillaire ou « sinus-lift ». La pose d'implants dentaires chez des patients sujets à des pertes osseuses importantes est un problème rencontré par de nombreux praticiens. En effet, à la suite d'une extraction dentaire en vue de la pose d'un implant, un processus de résorption osseuse (os alvéolaire) survient. Pendant les 6 premiers mois, il est possible de perdre jusqu'à 40% du volume total de l'os. Ce phénomène peut par la suite se poursuivre avec une intensité variant selon les cas. Parfois, le phénomène est tel qu'il est nécessaire de recourir à des techniques chirurgicales stimulant la formation osseuse de façon à rendre la mise en place d'implants possible (Woo and Le, 2004). Des greffes osseuses impliquant des interventions chirurgicales invasives (prélèvement d'os provenant d'autres régions du corps) étaient nécessaires. Toutefois, aujourd'hui, des matériaux synthétiques peuvent être utilisés durant des interventions sans anesthésie générale afin de stimuler la formation d'os, il s'agit de la régénération osseuse guidée (ROG) (Bottino et al., 2012; Suzuki and Bronstein, 2013; Zhang et al., 2013).

La pose d'implants au niveau du maxillaire et un défaut osseux à cet endroit nécessitent la mise en œuvre d'une ROG dans le cadre d'une technique chirurgicale particulière : l'élévation du sinus maxillaire ou « sinus-lift » (Figure 15). En effet, chez certains patients le manque osseux peut être dû à la résorption osseuse causée par une perte dentaire, un traumatisme, ou encore une maladie parodontale. Alors la mise en place d'implants n'est possible que si une élévation du sinus maxillaire est effectuée. Cette technique consiste à placer une matrice osseuse sous la muqueuse du sinus afin de stimuler la formation osseuse (Woo and Le, 2004). Le but est d'augmenter le volume osseux afin d'obtenir une hauteur suffisante pour la pose de l'implant tout en contribuant à protéger le sinus.

La procédure est mise en œuvre à l'intérieur de la bouche du patient. Le chirurgien pratique une incision au niveau de la gencive permettant ensuite d'élever un lambeau, exposant le mur latéral sinusien. Il ouvre ensuite une « fenêtre » dans le sinus (**Figure 15 A**). Celui-ci est recouvert d'une fine muqueuse qui sera soulevée afin de placer le matériau de ROG dans

l'espace nouvellement crée (**Figure 15 B, C**). Le lambeau est ensuite remplacé et suturé. Après 6 à 9 mois d'attente, si la procédure a réussi, un nouvel os s'est formé augmentant ainsi la hauteur osseuse (**Figure 15 D, E**). La procédure, grâce à l'augmentation du volume osseux, permet la pose et le soutien de l'implant (**Figure 15 F**).

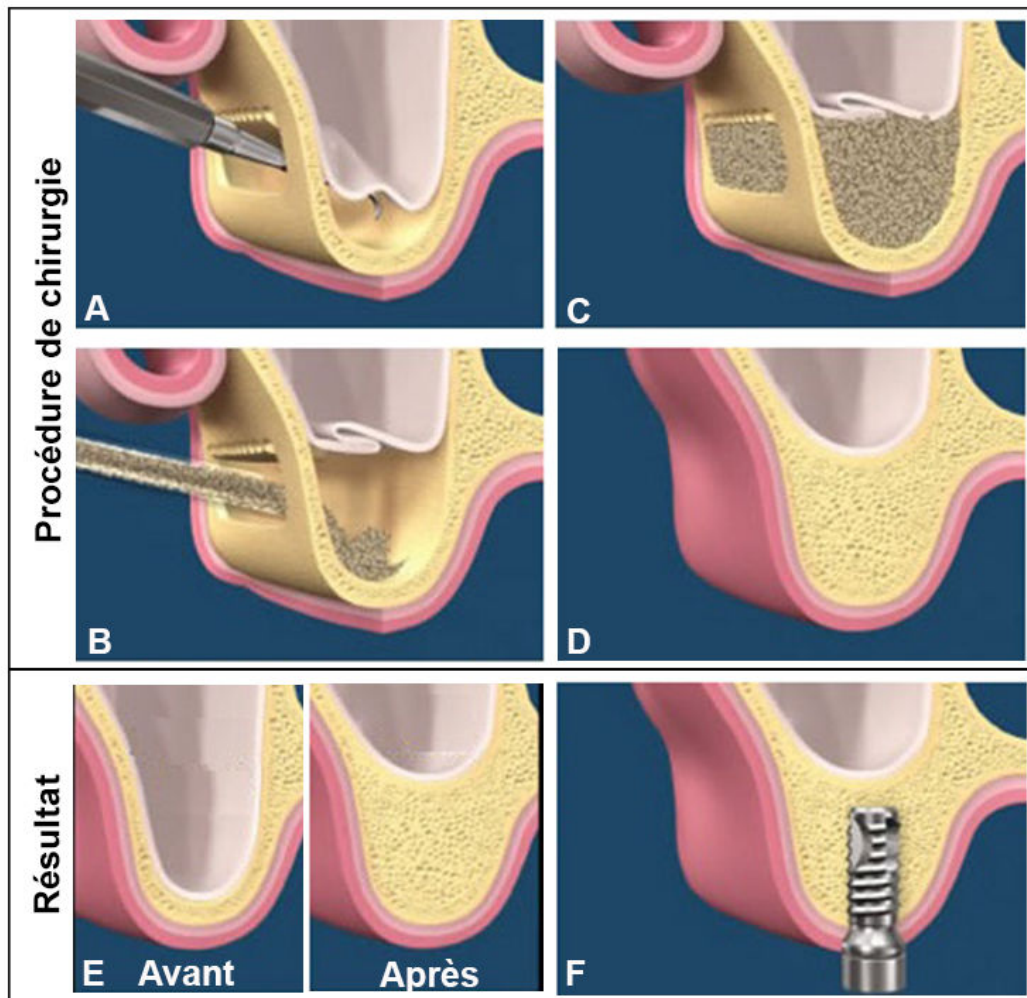


Figure 15: Procédure d'élévation du sinus maxillaire (Internet: 1888Implant.com)

L'élévation du sinus maxillaire est une technique chirurgicale bien spécifique à certains cas cliniques. Toutefois, le principe de cette technique peut être également applicable à différents sites chirurgicaux pour différentes causes mais toujours dans le but d'une augmentation d'un volume osseux perdu. Nous allons maintenant présenter les différents types de membranes pouvant être utilisés pour une régénération tissulaire/osseuse guidée.

3.3. Traitements actuels

3.3.1. Membranes non-résorbables

Les premières membranes non-résorbables ayant été mises sur le marché sont des membranes à base de **polytétrafluoroéthylène expansé** (e-PTFE, Cytoplast® TXT-200, Osteogenics Biomedical, USA), éventuellement **renforcées en titane** (Cytoplast® Ti-250, Osteogenics Biomedical, USA). Les premiers matériaux à base de PTFE expansé ont été utilisés en tant que vaisseaux artificiels (Florian et al., 1976). Ces mêmes matériaux ont ensuite été utilisés en régénération tissulaire guidée et en régénération osseuse guidée. Elles sont **inertes** et **biocompatibles**, elles assurent la séparation des tissus et agissent comme barrières cellulaires permettant l'intégration et la régénération tissulaire. Une étude a montré que l'utilisation de la membrane e-PTFE renforcée de titane conduisait à un potentiel de régénération plus important comparé à la membrane e-PTFE classique (Jovanovic and Nevins, 1995).

Cependant, l'inconvénient majeur des membranes non-résorbables se trouve dans la nécessité d'une **deuxième intervention chirurgicale** afin de retirer la membrane. Ceci a pour conséquences des risques d'endommager les tissus régénérés et des douleurs pour le patient mais entraîne également un coût supplémentaire. C'est pourquoi des membranes résorbables d'origine animale mais également d'origine synthétique ont été développées.

3.3.2. Membranes résorbables d'origine animale

Les **membranes dérivées de tissus collagéniques** sont les plus couramment utilisées. Le collagène pose cependant quelques problèmes du fait des risques de sensibilisation et de **contamination par les prions bovins** mais également des **risques inflammatoires** dus à son origine animale. Les membranes résorbables d'origine animale sont principalement dérivées de tissus collagéniques issus de la **peau humaine** (Alloderm®, LifeCell, Branchburg, USA), de **péritoine porcin ou bovin** (Bio-Gide®, Geistlich Pharmaceuticals, Princeton, USA), ou encore de **tendon d'Achille bovin** (Cytoplast® RTM Collagen, USA). Leur biorésorbabilité ainsi que leur excellente biocompatibilité est un atout majeur sur le marché des membranes pour la

RTG/ROG. D'autres avantages viennent s'ajouter tels que leur **propriété hémostatique** ou encore leur **maniabilité** au niveau chirurgical. Alloderm® est une membrane acellulaire lyophilisée essentiellement constituée de collagène de type I dérivé de peau collectée sur des cadavres humains (Bottino et al., 2009; Bottino et al., 2010). Selon le fournisseur, l'origine du collagène n'est pas un critère dommageable concernant les propriétés de régénération de la membrane (Livesey et al., 1995).

La **membrane Bio-Gide®**, constituée également de **collagène de type I** et commercialisée par Geistlich, possède une structure particulière en **bicouche** (Schlegel et al., 1997) (**Figure 16 A**). En effet, une face de la membrane est dense et lisse afin de prévenir toute invasion et prolifération cellulaire en provenance de l'épithélium au sein de la lésion osseuse. Sur l'autre face, la membrane présente une structure fibreuse et plus rugueuse permettant la colonisation cellulaire et la régénération osseuse (**Figure 16 B**). La membrane est placée face fibreuse vers la lésion osseuse.

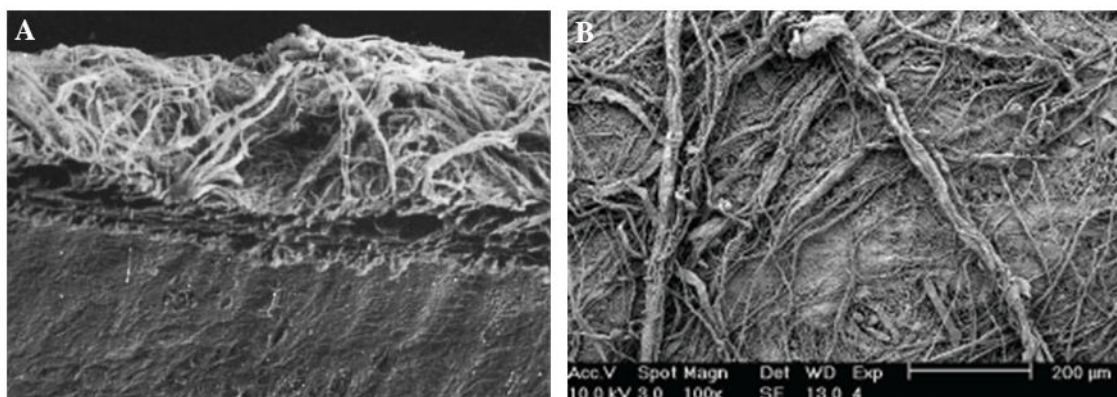


Figure 16: Observation au MEB de la membrane Bio-Gide® en coupe (A) et de sa surface fibreuse (B) (Adapté de (Schlegel et al., 1997) et(Zhang et al., 2013))

Malgré les avantages que présentent les membranes dérivées de tissus collagéniques au niveau de la biocompatibilité et de l'intégration tissulaire, il existe des désavantages conséquents à cette technologie. Tout d'abord, en terme économique, leur **coût très important** représente une première limite à leur utilisation. Des risques de transmission de maladies dus à l'origine animale ou humaine des membranes existent également (Dori et al., 2007). D'autre part, l'origine de ces membranes peut poser certains **problèmes d'éthique** et d'accessibilité vis-à-vis de certaines croyances religieuses. La **vitesse de dégradation du collagène** est également mise en cause. En

effet, ces membranes de collagène se dégradent et perdent de leur résistance mécanique rapidement pouvant provoquer l'effondrement ou la perte de volume osseux nouvellement régénéré. Le **degré de réticulation** étant lié à la vitesse de dégradation des matrices de collagène, des solutions ont été développées afin d'augmenter la stabilité des membranes parmi lesquelles on trouve la **réticulation chimique** ou **physique** par des traitements aux rayons ultraviolets, au glutaraldéhyde, ou encore à la génipine (agent de réticulation). Une attention particulière à éliminer toute trace d'aldéhydes ou d'amides doit être portée lors de tels traitements. En effet, la présence de tels produits peut induire des réactions inflammatoires ainsi que des dommages aux tissus environnants (Tal et al., 2012). Cependant, des recherches menées par Bottino et collaborateurs sur la membrane AlloDerm® ont montré que l'addition d'un agent de réticulation naturel tel que la génipine affecte de manière positive les propriétés mécaniques et la stabilité de la membrane de collagène (Bottino et al., 2010). Malgré certains avantages apportés par les membranes de collagène, des limites subsistent quant à leur utilisation, d'où les nombreuses recherches effectuées afin de développer des **membranes synthétiques**.

3.4. Traitements prometteurs : les polymères synthétiques actifs, une nouvelle alternative

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il s'agit majoritairement, pour les membranes d'origine synthétique, de **membranes à base de polyesters** (par exemple de polymère de type acide polyglycolide (PGA), acide polylactide (PLA), ou **poly(ϵ -caprolactone)** (PCL), ou encore de leurs copolymères associés. Les biomatériaux inertes ainsi que les différentes techniques de mise en œuvre des membranes à base de polymères synthétiques ont été décrites dans un paragraphe précédent (I.3.1. Biomateriaux inertes et techniques de mises en œuvre). Comme mentionné précédemment, la technique que nous avons choisi de développer et d'optimiser durant notre projet de thèse a été la technique de **l'électrospinning du polycaprolactone (PCL)**. Les membranes obtenues sont **nanofibreuses, microporeuses, biocompatibles et biodégradables**. Afin d'améliorer leur efficacité en terme de régénération osseuse, nous avons choisi la technique des **films multicouches de polyélectrolytes** pour fonctionnaliser nos membranes car pour de nombreuses raisons, cette technique nous semble la

méthode de fonctionnalisation la plus digne d'intérêt et la plus prometteuse. Le principe de cette technique de fonctionnalisation a été précédemment expliqué (I.3.2. Biomatériaux actifs et facteurs de croissance). Cette technique présente de nombreux avantages : elle est simple et facile à mettre en œuvre, elle ne requiert que peu de matériel (selon les différentes méthodes de dépôts) et permet d'intégrer de façon durable des composés ostéoconducteurs ou encore mieux ostéoinducteurs au sein des membranes.

Différentes méthodes de dépôt des polyélectrolytes ont été développées afin de diminuer le temps d'élaboration des films multicouches. Cependant, la méthode plus utilisée reste celle du « **dip-coating** » ou **méthode par trempage**. Malgré le fait que cette méthode soit la plus chronophage, elle reste la plus facile, la plus pratique à mettre en œuvre et la moins coûteuse en matériel, c'est pourquoi nous avons choisi cette méthode de dépôt.

De plus, la technique des LBL trouve également son intérêt dans l'**universalité** de son application. En effet, cette technique est applicable à tout type de surfaces complexes. Les premiers substrats utilisés étaient le verre (Decher, 1997; Lee et al., 2006a), le mica (Kim et al., 1999), le quartz (Lvov et al., 1995), le silicium ou encore l'or (Laurent and Schlenoff, 1997). Les alliages métalliques en titane (Thierry et al., 2003 ; Porter et al., 2009 ; Park et al., 2011) et acier inoxydable (Meng et al., 2009) ont également fait l'objet de recherches en tant que substrat pour des applications biomédicales. Ensuite, la recherche s'est tournée vers des **substrats implantables** à base de polymères synthétiques tels que l'acide poly(D,L-lactique) (PDLLA) (Zhu et al., 2004), le PCL (Maurer et al., 1996 ; Dubas et al., 2009), le polyéthylène téréphtalate (PET) (Ducy et al., 1996), ou le silicone (Denhardt and Guo, 1993). L'adsorption du polyélectrolyte sur le substrat est alors possible grâce aux **interactions de type van der Waals ou hydrophobes** (Hammond, 1999; Kotov, 1999). Une autre méthode consiste à prétraiter le substrat au poly(éthylèneimine) (PEI) pour engendrer une surface chargée stable (Zhu et al., 2004). La construction des films multicouches peut aussi être effectuée sur des substrats dégradables afin d'obtenir des microcapsules creuses ou hybrides. Ces microcapsules peuvent être utilisées dans le domaine biomédical comme vecteurs ciblés de principes actifs. Elles permettraient la libération contrôlée du principe actif en fonction du nombre de multicouches appliquées à leur surface (Skerry et al., 1989 ; Johnston et al., 2006 ; Facca et al., 2009).

Enfin, la facilité de mise en œuvre des LBL ainsi que les possibilités diverses de compositions de multicouches en font un domaine de recherche à part entière. Un grand nombre

de molécules différentes peut être envisagé dans le cadre de cette technique. En effet, les **polyélectrolytes** utilisés sont des polymères possédant **des sites ioniques** et/ou **ionisables**. En solution dans un solvant, les polymères dissociés présentent des charges au niveau de leur squelette carboné et des contre-ions de charge opposée apparaissent. Les charges présentes dépendent principalement des **groupements chimiques** du polymère et du **pH de la solution**. Les **polycations** ou polybases sont les polymères chargés positivement, et inversement les **polyanions** ou polyacides sont les polymères chargés négativement. Le choix des polyélectrolytes à utiliser (naturels ou synthétiques) est à déterminer en fonction de l'application et de la cible thérapeutique visée.

Différents polymères synthétiques ont été étudiés dans le cadre de la construction de films multicouches. Il est intéressant de citer les polyélectrolytes tels que le polyéthylèneimine (PEI), le poly(styrène sulfonate) (PSS), le chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMAc), le poly(acide acrylique) (PAA), ou encore le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH). Ces polyélectrolytes ont souvent été utilisés dans le but de comprendre les **mécanismes physico-chimiques** intervenant dans la construction et la stabilité des multicouches. D'ailleurs, grâce à leur stabilité, ils peuvent servir notamment de **films précurseurs** pour la construction de films multicouches à base de polyélectrolytes naturels (Baron, 1995; Muller et al., 2006 ; Dubas et al., 2009;). Ils peuvent également être utilisés avec des molécules bioactives afin d'apporter des propriétés biologiques au film (Samuel et al., 2011). Cependant, aucun de ces polyélectrolytes synthétiques n'est utilisable en clinique car non approuvés par les autorités compétentes, certains sont même **potentiellement cytotoxiques et dangereux** (Beertsen and Van den Bos, 1992).

Notre intérêt se porte principalement vers les **polyélectrolytes d'origine naturelle**, en particulier vers les polypeptides et les polysaccharides tels que **la poly(L-lysine) (PLL)** ou le **chitosane (CHI)**. En effet, grâce à leur biocompatibilité, les polyélectrolytes naturels sont très intéressants pour une application dans le domaine biomédical. Afin d'ajouter des propriétés biologiques plus spécifiques, des substances bioactives telles que des médicaments, des peptides, ou encore des protéines peuvent être utilisées ou incorporées dans les multicouches à condition d'être chargées.

La poly(L-lysine) est un homopolymère de la L-lysine qui est un des acides aminés constituant les protéines (**Figure 17 A**). Très souvent utilisé en biologie car **biocompatible** et

biodégradable, ce polymère peut être utilisé pour le transport de principe actif (Ryser and Shen, 1978) ainsi que pour le transfert de gènes (Anas, 2004). La PLL est un polymère chargé positivement : elle peut se complexer avec l'ADN, et être utilisée comme vecteur non viral dans les thérapies géniques. C'est aussi un polypeptide permettant la modification de charge d'une surface. En rendant la surface positive, celle-ci peut interagir avec la membrane plasmique des cellules qui est négative et améliorer l'adhésion cellulaire de nombreux types cellulaires (Jacobson and Branton, 1977). D'autre part, le greffage de molécules actives telles que l' α -mélanocortine (α -MSH) est possible grâce à ses nombreux groupements chimiques accessibles (Chluba et al., 2001; Benkirane-Jessel et al., 2004a; Fioretti et al., 2010). La PLL semble être un polyélectrolyte prometteur comme élément dans la construction de films multicouches pour une application en ingénierie tissulaire.

Un autre type de polyélectrolyte, les polysaccharides, peut rentrer dans la composition des LBL. Les polysaccharides les plus intéressants de part leurs propriétés sont le **chitosane** et **l'acide hyaluronique (HA)**. L'acide hyaluronique est un polysaccharide anionique. C'est le seul glycosaminoglycane (GAG) non sulfaté, il est composé d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine. Il est présent dans l'humeur vitrée de l'œil, il est aussi très abondant dans la MEC et dans le liquide synovial. Ses nombreuses propriétés font de lui un composant très utilisé pour des applications biologiques (Reichenbach et al., 2007 ; Ikeuchi et al., 2014; Martins et al., 2014; Purcell et al., 2014;). L'acide hyaluronique est notamment utilisé dans des produits cosmétiques ou des collyres pour ses propriétés d'hydratation (Fakhari and Berkland, 2013). Il est également utilisé dans le domaine de la chirurgie réparatrice pour ses propriétés de lubrification. Par ailleurs, il est injecté par voie intra-articulaire pour soigner l'arthrose sous le nom d'Hyalgan® (Bellamy et al., 2006; Reichenbach et al., 2007).

L'autre polysaccharide très utilisé est le **chitosane (Figure 17 B)**. Ce polymère fait partie de la famille des chitineux. Le chitosane est un polycation naturel constitué d'une distribution aléatoire de D-glucosamine (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée). Il est produit à partir de la **chitine** par **désacétylation partielle** en **milieu alcalin** (soude concentrée) ou par **hydrolyse enzymatique** en présence de chitine désacétylase (Rinaudo, 2006). Le **degré d'acétylation (DA)** correspond au pourcentage d'unités acétylées (N-acétyl-D-glucosamine) par rapport au nombre total d'unités. La valeur seuil séparant la chitine et le chitosane correspond à un **DA de 60 %** : tout polymère chitineux dont le DA est inférieur à 60 %

est nommé chitosane, et inversement la chitine correspond au polymère dont le DA est supérieur à 60 % (Illum, 1998; Sorlier et al., 2001).

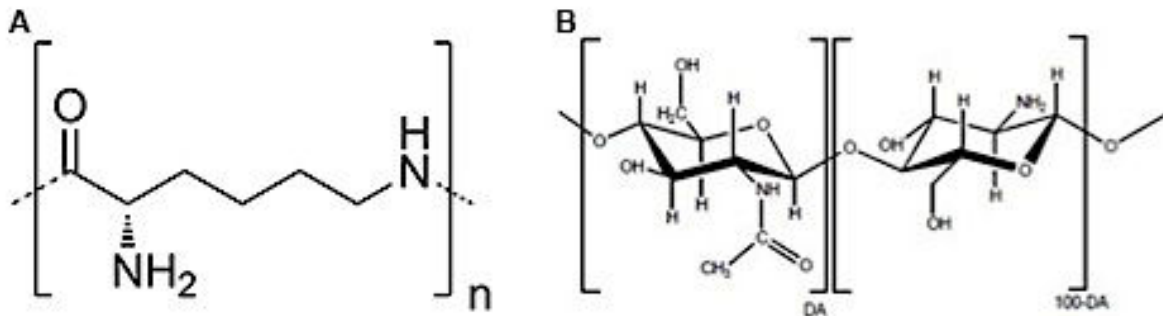


Figure 17: Structure chimique de la PLL (A) et du chitosane (B), DA : degré d'acétylation, n: nombre de monomères

Le chitosane est un polymère **biocompatible** et **biodégradable autorisé par la FDA**. Il est connu pour être non toxique, **biologiquement actif** et pour ses propriétés hémostatiques (Anderson, 1995; Rinaudo, 2006). Depuis plusieurs années, les recherches se sont concentrées sur les applications biomédicales du chitosane, et des implants en chitosane sous forme d'hydrogels, de membranes fibreuses ou d'éponges ont été développés (Cooper et al., 1992; Randell et al., 1995 ; Gullberg et al., 1997; Dempster, 2011).

Par ailleurs, grâce à ses propriétés biologiques et sa structure chimique, le chitosane possède les qualités nécessaires pour la construction de films multicouches. Il peut être associé à différents polyanions naturels tels que la gélatine (Cai et al., 2005), l'alginate (Deng et al., 2011), ou l'acide hyaluronique (Thierry et al., 2003; Thierry et al., 2005 ; Chua et al., 2008). **L'incorporation de molécules actives** (facteurs de croissance, médicaments, anti-inflammatoires) sans conséquences néfastes pour leur activité est également possible. Ceci permet d'engendrer des **propriétés biologiques spécifiques** (Benkirane-Jessel et al., 2004a; Benkirane-Jessel et al., 2004b). En effet, les films multicouches incorporant le principe actif constituent un **système bioactif à libération contrôlée**. Il a d'ailleurs été montré que les peptides et protéines insérés au sein de multicouches gardaient **l'intégrité de leur activité biologique** (Jessel et al., 2003 ; Benkirane-Jessel et al., 2005; Fioretti et al., 2010). Des études ont montré que des films multicouches de polyélectrolytes incluant les facteurs de croissance TGFβ et BMP-2 induisaient la différenciation de cellules souches embryonnaires en cellules

osseuses et cartilagineuses. Des matrices ainsi fonctionnalisées pourraient être des solutions prometteuses pour la régénération osseuse à partir de cellules souches embryonnaires (Dierich et al., 2007). Par ailleurs, une technologie développée par notre laboratoire a permis d'incorporer des molécules actives (facteurs de croissance, SiRNA) dans des **nanoréservoirs** adsorbés à la surface de nanofibres de membranes de PCL ou encore à la surface de particules (Facca et al., 2010; Zhang et al., 2010a ; Mendoza-Palomares et al., 2012). Cette nanostructure permettant la libération des facteurs de croissance au contact des cellules empêche la libération passive des principes actifs et favorise leur protection ainsi qu'une **libération continue et progressive** au cours du temps.

Durant ce projet de thèse, les polyélectrolytes choisis pour le développement de nos nanoréservoirs actifs ont été le chitosane et des dérivés de polylysine concernant les polycations. Quant aux principes actifs incorporés, nous avons opté pour l'utilisation de BMP-2 et de BMP-7.

Les rappels bibliographiques ayant été effectués, nous allons maintenant détailler la problématique et les objectifs de ces travaux de thèse. Par la suite, nous décrirons le matériel et les différentes méthodes utilisés.

II. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Mon travail de thèse repose sur une démarche innovante consistant à développer de nouveaux biomatériaux actifs et/ou vivants fonctionnalisés avec des nanoréservoirs et/ou des cellules. Pour une application en orthopédie, notre stratégie cible les lésions osseuses dues à des traumatismes osseux tels que les fractures accidentelles ou liées à des maladies comme l'ostéoporose ou la pseudarthrose. Les domaines de la chirurgie maxillo-faciale et des maladies parodontales se trouvent être également des domaines d'application de notre technologie. Dans ce but, nous avons développé une technologie permettant de fonctionnaliser de façon simple et à moindre coût différents types de biomatériaux, les rendant ainsi bioactifs. Nous proposons de développer un implant (membrane implantable active) biodégradable et nanostructuré permettant d'accélérer la réparation du tissu osseux. Notre stratégie innovante repose sur la mise en œuvre de membranes par électrospinning mais aussi sur leur fonctionnalisation par des facteurs de croissance. L'électrospinning est une technique de mise en œuvre choisie pour sa capacité à produire une membrane nanofibreuse permettant de mimer idéalement la matrice extracellulaire du tissu osseux. De plus, la mise en œuvre d'un polymère biodégradable et biocompatible déjà approuvé par la FDA (US Food and Drug Administration) tel que le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) est un choix stratégique pour une future application en clinique. Notre stratégie de fonctionnalisation originale a consisté à enrober des facteurs de croissance dans des nanoréservoirs de polypeptides ou de polysaccharides.

Notre travail s'est organisé autour de 4 axes :

- 1) Le développement d'une stratégie de fonctionnalisation innovante permettant l'accélération de la régénération osseuse.

Cette première partie de notre projet avait pour but d'appliquer notre stratégie de fonctionnalisation de nanoréservoirs bioactifs à un support commercial déjà existant sur le marché. Ayant pour objectif une application clinique, nous avons utilisé uniquement des produits approuvés par la FDA pour rendre actives ces membranes. La membrane choisie était la « Bio-Gide® » commercialisée par Geistlich. Cette membrane déjà utilisée en clinique est constituée de collagène d'origine animale. Nous avons incorporé des nanoréservoirs de BMP-2 afin d'améliorer les performances de la Bio-Gide® en terme de régénération osseuse.

- 2) Le développement de membranes synthétiques fines nanofibreuses actives adaptées à la régénération osseuse.

Afin de remplacer les membranes d'origine xénogénique actuellement utilisées en clinique, nous nous sommes proposés de développer une membrane synthétique biologiquement active pour la régénération osseuse. L'objectif est de fabriquer une telle membrane grâce à la technique de l'électrospinning permettant de mimer la structure de la matrice osseuse. Le choix du polymère utilisé s'est porté sur le poly(ϵ -caprolactone) (PCL). Le PCL est biocompatible, biodégradable avec des produits de dégradation non toxiques et approuvé par la FDA. Les conditions du procédé ont ainsi été déterminées afin d'obtenir des membranes ostéoconductrices mimant le tissu natif et qui sont désignées sous l'appellation de « membranes fines ». Puis, afin de favoriser une induction osseuse, les membranes fines de PCL nanofibreuses ont été fonctionnalisées par incorporation de BMP-2 dans des nanoréservoirs grâce à la technique des multicouches de polyélectrolytes. D'autre part, un autre intérêt était de former ces nanoréservoirs à partir de macromolécules de natures différentes afin de pouvoir comparer le mode d'immobilisation du principe actif.

- 3) L'optimisation de l'électrospinning pour développer des implants 3D épais.

Afin de pouvoir réparer des lésions osseuses de tailles plus importantes, nous avons tenté d'élaborer une nouvelle structure nanofibreuse par électrospinning dont l'épaisseur dépasserait facilement le centimètre. Le polymère électrospinné est resté inchangé. Cependant, les paramètres du procédé ont été modifiés et optimisés pour l'élaboration de cette nouvelle structure nanofibreuse et les conditions nécessaires à la reproductibilité du procédé ont été déterminées. Cette partie du projet présente un nouveau type de structures électrospinnées, appelées « implants 3D » afin de les distinguer des membranes fines. Par la suite, les implants ont été caractérisés par mesure de la taille des fibres et des pores, et la porosité a été estimée. Nous avons également établi le potentiel de tels implants 3D à induire une régénération osseuse *in vitro*.

- 4) La double fonctionnalisation des implants 3D épais par des nanoréservoirs actifs et des cellules pour accélérer la régénération osseuse.

Pour parvenir à une régénération osseuse plus rapide et durable, les implants 3D sont rendus bioactifs par des nanoréservoirs à base de chitosane incorporant le facteur de

croissance BMP-7 (approuvés par la FDA). De plus, des cellules primaires autologues spécifiques du patient mais aussi des cellules souches dérivées de la moelle osseuse de donneurs ont été utilisées en combinaison avec l'implant 3D fonctionnalisé ou non, afin d'étudier l'effet de la double fonctionnalisation en terme de régénération osseuse.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation des biomatériaux

1.1. Mise en œuvre des biomatériaux par electrospinning

1.1.1. Fabrication des membranes fines

➤ *Matériel et réactifs*

- Barreau aimanté et agitateur magnétique
- Pilulier
- Balance
- Éprouvette graduée de 10 mL
- Appareillage d'electrospinning « Electrospinning Apparatus » EC-DIG (IME Technologies, Pays-Bas)
- Pousse-seringue (ProSense B.V, Allemagne)
- Seringue de 5 mL
- Tuyau de polydiméthylesiloxane
- Polycaprolactone (Capa6800, PERSTORP, Suède)
- Dichlorométhane (DCM) (Sigma-Aldrich, France)
- Diméthylformamide (DMF) (Sigma-Aldrich, France)

Le polymère et les solvants utilisés dans l'élaboration des membranes sont détaillés dans le tableau 2 :

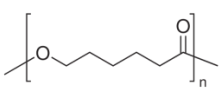
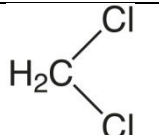
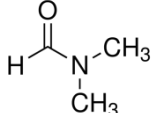
Nom du produit	Formule chimique	Solvant du PCL	Masse molaire (g/mol)	Constante diélectrique	Température d'ébullition (°C)	densité	Fournisseur
Poly(ϵ -caprolactone)		-	80000	-	-	1,14	Capa6800, Perstorp
Dichlorométhane		Bon solvant	84.9	9,0	39.8	1.32	Sigma-Aldrich
Diméthylformamide		Mauvais solvant	73.1	36,7	153	0.94	Sigma-Aldrich

Tableau 2 : Polymères et solvants utilisés dans le procédé d'electrospinning

La mise en œuvre des membranes est effectuée grâce à un appareillage standard Electrospinning Apparatus EC-DIG (**Figure 18**) fourni par IME Technologies (Amsterdam, Pays-Bas). Cet appareillage est constitué d'une enceinte fermée dotée d'une aération reliée à une extraction chimique, d'un pousse seringue et de sa commande, d'un support vertical afin de maintenir une aiguille de 21 G (0,8 mm de diamètre) à distance d'un collecteur conducteur de 10 cm de diamètre. La gamme de tension fournie par le générateur intégré à l'appareillage est de + 25 kV / -25 kV (aiguille / collecteur). La commande du générateur se fait par l'intermédiaire d'un écran tactile. Ce montage permet d'élaborer des implants fins et épais nanofibreux et microporeux.

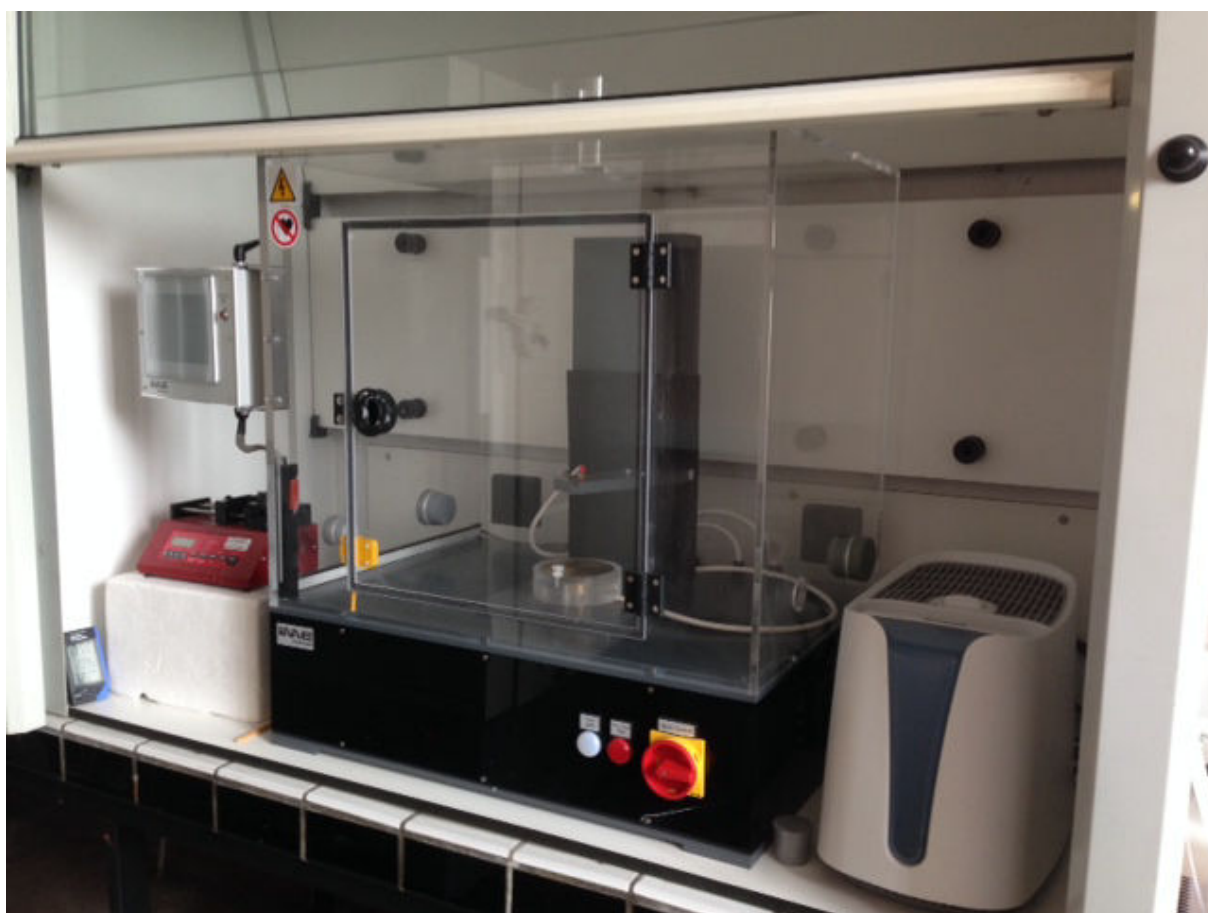


Figure 18: Appareillage standard Electrospinning Apparatus EC-DIG fourni par IME Technologies

➤ Méthode

La production des membranes fines électrospinnées se fait à partir d'une solution de polymère poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et d'un mélange de dichlorométhane (DCM) et de

diméthylformamide (DMF). La solution de polymère est constituée de PCL à 23 % (23 mg pour 100 mL de solution) solubilisé dans un mélange DCM/DMF (40/60, v/v). Ensuite, cette solution est électrospinnée grâce à l'appareillage standard décrit plus haut. À l'aide d'une seringue de 5 mL placée dans le pousse seringue de l'appareillage, la solution de polymère est acheminée de la seringue jusqu'à l'aiguille grâce à un tuyau en polydiméthylsiloxane (PDMS). La solution de PCL est alors électrospinnée pendant 20 min, sous une tension de 22 kV, à un débit de 0,4 mL/h, à une température de $19 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $45 \pm 5\%$. Les fibres sont collectées au niveau d'un collecteur circulaire se situant à environ 16 cm de distance de l'aiguille d'injection. Un numéro est attribué à chaque membrane et toutes les données sont collectées pour archivage. À la fin du procédé, la membrane est récupérée et les traces de solvants restant de l'électrospinning sont éliminées par étuvage.

1.1.2. Mise en œuvre des implants 3D épais

➤ *Matériel et réactifs*

- Barreau aimanté et agitateur magnétique
- Pilulier
- Balance
- Éprouvette graduée de 10 mL
- Appareillage d'électrospinning « Electrospinning Apparatus » EC-DIG (IME Technologies, Pays-Bas) (**Figure 18**)
- Pousse seringue (ProSense B.V, Allemagne)
- Seringue de 5 mL
- Plaque de polyméthacrylate de méthyle percée
- Tuyau de polydiméthylsiloxane
- Polycaprolactone (Capa6800, PERSTORP, Suède)
- Dichlorométhane (DCM) (Sigma-Aldrich, France)
- Diméthylformamide (DMF) (Sigma-Aldrich, France)

➤ *Méthode*

Afin d'élaborer des implants 3D, le même matériel ainsi que le même appareillage que pour l'élaboration des membranes fines sont utilisés. Cependant, une plaque de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) de 2,5 mm d'épaisseur percée d'un trou de 25 mm de diamètre est en plus placée sur le collecteur. Cette plaque permet à la fois d'isoler une partie de la surface du collecteur et de concentrer le champ électrique au sein d'une zone restreinte provoquant la croissance en hauteur de la membrane. La concentration de la solution de PCL utilisée est de 26 % (26 mg pour

100 mL de solution dans un mélange DCM/DMF (40/60, v/v). Le débit de la solution est réglé à 1,2 mL.h⁻¹, une tension de +15 kV / -3 kV (aiguille/collecteur) est appliquée en début d'électrospinning. Après 15 min d'électrospinning, la tension est augmentée de 1kV alternativement en positif et négatif toutes les 15 min environ jusqu'à atteindre 2 h d'expérience. Les conditions atmosphériques sont de 23 ± 2 °C et 30 ± 5 % d'humidité relative. De même, à la fin du procédé, l'implant 3D (**Figure 19**) est récupéré et les traces de solvants restant sont éliminées par étuvage.

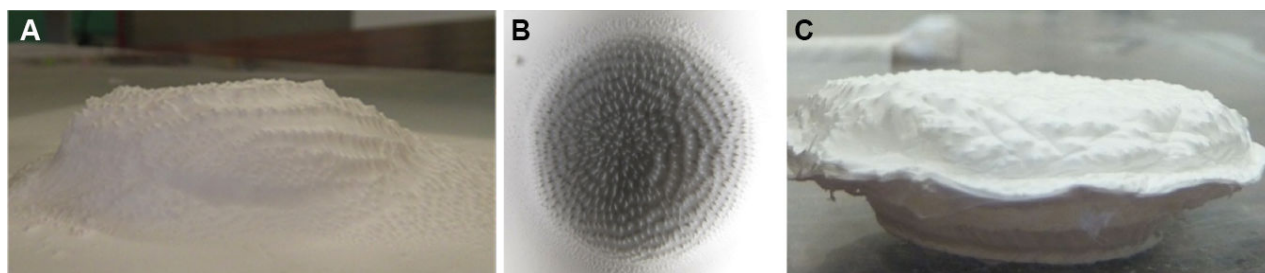


Figure 19: Implants 3D après electrospinning (A), vue de dessus (B), vue de profil (C)

1.2. Fonctionnalisation des biomatériaux

1.2.1. Préparation des solutions

➤ *Matériel et réactifs*

- Bouteille de 1 L
- Barreau aimanté et agitateur magnétique
- pHmètre
- Tampon acide 2-morpholinoéthanesulfonique (MES) (Sigma-Aldrich, France)
- Chlorure de sodium (NaCl) (Euromedex, France)
- Chitosane (CHI) (Protasan UPCL 113, Novamatrix, Norvège)
- Poly(L-lysine) (PLL) (Sigma-Aldrich, France)
- Protéine recombinante humaine morphogénétique osseuse 2 ou 7 (en anglais rhBMP-2 ou 7) (BIO BASIC INC, Euromedex, France)

➤ *Méthode*

La technique de fonctionnalisation utilisée est celle des multicouches de polyélectrolytes. Une solution tampon constituée de MES à 40 mM et de NaCl à 150 mM, à pH 5,5 est utilisée afin de diluer les polyélectrolytes et de rincer les polyélectrolytes non adsorbés entre chaque dépôt. La solution de polycation est constituée de chitosane grade clinique dilué dans la solution tampon à la concentration de $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$, ou bien de PLL dilué à la concentration de $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. La solution de polyanions est constituée des facteurs de croissance rhBMP-2 ou 7 dilués dans le même tampon à la concentration de 200 ng.mL^{-1} .

1.2.2. Fonctionnalisation des membranes par dépôt de multicouches de polyélectrolytes

➤ *Matériel et réactifs*

- Membranes fines et implants 3D électrospinnés
- Lames de rasoir
- Emporte-pièce de 12 mm (JLB340P BOEHM®, France) ou de 5 mm de diamètre (Biopsy punch, Stiefel®, Afrique du Sud)
- Plaques de 24 ou 96 puits
- Inserts et cerclages pour plaque de 24 puits (Cell Crown™ inserts, Scaffdex, Sigma-Aldrich, France)
- Solution tampon MES
- Solutions de polycations et polyanions

➤ *Méthode*

Afin de les préparer à la fonctionnalisation, les membranes fines et les implants 3D sont découpés à l'emporte-pièce : 12 mm de diamètre pour les membranes fines et 5 mm de diamètre pour les implants 3D. Concernant les membranes fines, chaque membrane découpée est ensuite montée sur insert (fourni par Scaffdex) (**Figures 20**) pour éviter que la membrane ne se froisse ou ne se replie sur elle-même. Les implants 3D sont placés dans les puits des plaques de 96 sans inserts.

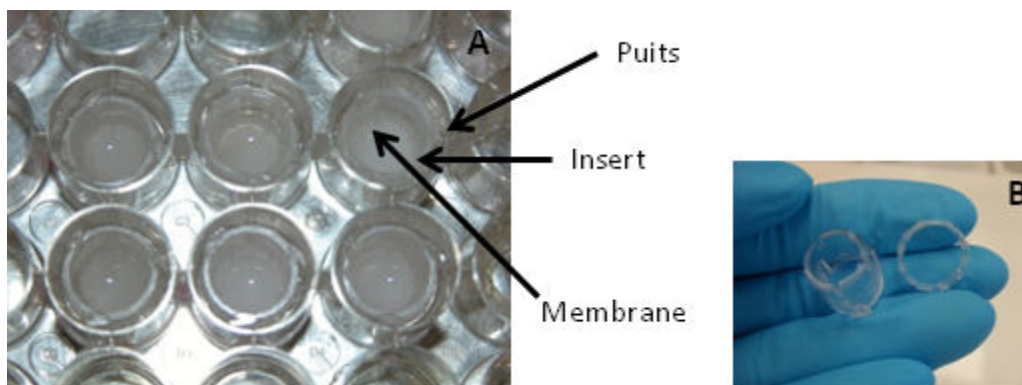


Figure 20: Image macroscopique de membranes fines de PCL électrospinnées dans une plaque de 24 puits avec un montage sur insert (A). Image d'un insert (B)

Ensuite, chaque puits contenant la membrane fine ou épaisse (avec ou sans insert) est rempli de 2 mL de solution tampon laissée une nuit à 4 °C avant le début de l'expérience. La solution tampon est ensuite remplacée par 300 μ L d'une solution de polycations (chitosane ou PLL) puis l'étape de rinçage est effectuée avec 2 mL de solution tampon. La solution tampon du rinçage est alors remplacée par 300 μ L de la solution de polyanions (BMP-2 ou 7), et une dernière étape de rinçage avec la solution de tampon est de nouveau effectuée. Chaque incubation des différentes solutions dure 15 min, une bicouche est ainsi réalisée en 1 h. Ce procédé est renouvelé jusqu'à atteindre le nombre de bicouches souhaité afin d'obtenir des nanoréservoirs actifs (CHI/BMP-2)₃, (PLL/BMP-2)₃, (CHI/BMP-2)₆, (PLL/BMP-2)₆ ou (CHI/BMP-7)₄ adsorbés à la surface des nanofibres.

Une fois la fonctionnalisation effectuée, le dernier rinçage est remplacé par du PBS (phosphate buffered sodium) ou du milieu de culture sans sérum afin d'équilibrer le pH. Les plaques sont placées à 37°C toute la nuit avant ensemencement ou implantation.

1.3. Observation et caractérisation des membranes au microscope électronique à balayage

➤ *Matériel et réactifs*

- Membranes électrospinnées et/ou fonctionnalisées
- Emporte-pièce de 5 mm de diamètre (Biopsy punch, Stiefel®, Afrique du Sud)
- Porte-échantillons (Euromedex, France)
- Ruban adhésif conducteur double face
- Métalliseur Cressington 108auto/SE (ELOISE SARL, France) (**Figure 21**)
- Mini-SEM Hitachi TM-1000
- Tampon phosphate salin (PBS, Invitrogen™ Life technologies™, France)
- Glutaraldéhyde 2,5 % (Euromedex, France)
- Éthanol 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 100 % (VWR, France)
- Hexaméthylidisilazane (HMDS, Euromedex, France)



Figure 21: Métalliseur Cressington 108auto/SE muni de sa pompe Duo Line

➤ *Méthode*

Les membranes électrospinnées sont découpées à l'emporte-pièce et collées sur un porte-échantillons à l'aide d'un ruban adhésif carboné double face conducteur. Les échantillons sont ensuite métallisés par pulvérisation d'une couche or/palladium cathodique sous argon à l'aide d'un métalliseur Cressington 108auto/SE muni d'une pompe Duo Line (**Figure 21**). Après la métallisation, les échantillons sont laissés 1h sous vide.

D'autre part, les membranes ayant subi une fonctionnalisation nécessitent d'être traitées et déshydratées avant métallisation. En effet, après fonctionnalisation, les membranes sont fixées au glutaraldéhyde 2,5 % dilué dans du PBS durant 10 min à température ambiante. Ensuite, trois rinçages de 5 min au PBS sont nécessaires afin d'éliminer le glutaraldéhyde. L'étape de déshydratation débute alors à l'aide de bains successifs de 20 min d'éthanol à concentration croissante : 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, et 100 %. Après le dernier bain d'éthanol absolu, les membranes sont enfin plongées dans un bain de HMDS pendant 3 min afin de compléter la déshydratation. Les membranes sont finalement séchées sous dessiccateur pendant 30 min, puis montées sur porte-échantillons pour être métallisées et observées.

La qualité, le diamètre des fibres ainsi que la taille des pores sont contrôlés et mesurés au microscope électronique à balayage (MEB) Hitachi TM-1000. Le traitement des images est effectué à l'aide du logiciel Image J.

2. Caractérisation *in vitro* des implants nanofibreux

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Milieux et types cellulaires

➤ *Matériel et réactifs*

- Lignée cellulaire MG-63
- Ostéoblastes humains primaires (PromoCell, France)
- Cellules souches mésenchymateuses (CSMs) humaines (PromoCell, France)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (BioWhittaker® Lonza, France)
- Pénicilline/Streptomycine (50 U.mL⁻¹)/ (50 µg.mL⁻¹) (BioWhittaker® Lonza, France)
- Amphotéricine B (2,5 µg.mL⁻¹) (BioWhittaker® Lonza, France)
- Pyruvate de sodium (100 mM) (Gibco® Life technologies™, France)
- Glutamine (200 mM) (PAA, France)
- Sérum de veau fœtal (10 %, Gibco® Life Technologies™, France)
- Osteoblast Growth Medium (PromoCell, France)
- Supplement Mix (PromoCell, France)
- Mesenchymal Growth Medium (PromoCell, France)
- Alpha MEM (Minimum Essential Medium) (BioWhittaker® Lonza, France)
- β-glycérophosphate (10 mmol.L⁻¹, Sigma)
- Ascorbate-2-phosphate (50 µg.mL⁻¹, Sigma)
- Dexaméthasone (10 nmol.L⁻¹, Sigma)

➤ *Méthode*

Durant ce travail, plusieurs types cellulaires ont été utilisés : une lignée cellulaire d'ostéoblastes MG-63, des ostéoblastes humains primaires (Hob) achetés chez PromoCell, ainsi que des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs). Les MG-63 proviennent d'un ostéosarcome humain, les Hob sont isolés à partir du genou ou de la jonction hanche/fémur de l'Homme, enfin les hCSMs sont dérivées de la moelle osseuse humaine.

Concernant le milieu de culture des MG-63, celui-ci est composé de DMEM, supplémenté avec de la pénicilline, de la streptomycine, de l'amphotéricine B, du pyruvate de sodium et 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté. Le milieu de culture des Hob quant à lui est constitué du milieu pour ostéoblastes spécifique et du « supplement mix » fourni par PromoCell et supplémenté avec de la pénicilline et de la streptomycine. Enfin, le milieu de culture des hCSMs est constitué

du milieu spécifique et du « supplement mix » fourni par PromoCell supplémenté avec de la pénicilline et de la streptomycine.

Le milieu de différenciation ostéogénique des hCSMs est constitué de milieu Alpha MEM supplémenté avec de la pénicilline, de la streptomycine, de l'amphotéricine B, de pyruvate de sodium, 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, et de la glutamine. Du β -glycérophosphate, de l'ascorbate-2-phosphate et de la dexaméthasone sont également ajoutés.

Le milieu de minéralisation, pour les MG-63 comme pour les Hob, est composé du milieu de culture de base DMEM supplémenté auquel on ajoute les mêmes composés que pour le milieu de différenciation ostéogénique.

2.1.2. Culture cellulaire d'ostéoblastes et de CSMs humains

➤ *Matériel et réactifs*

- Flasques de culture ventilées de 75 cm² avec bouchon à filtre
- Pipettes de 2, 5 et 10 mL
- Incubateur IGO 150 Cell life (Thermo Electron Corporate)
- Centrifugeuse (Jouan BR4i multifunction centrifuge, Thermo Scientific, France)
- Cellules MG-63/Hob/hCSM
- Trypsine 2,5 % (BioWhittaker® Lonza, France)
- Tampon phosphate salin (PBS, Invitrogen™ Life technologies™, France)
- Milieu de culture MG-63/Hob/hCSM
- Cellule de Neubauer
- Bleu de Trypan

➤ *Méthode*

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm² et maintenues dans leur milieu de culture dans un incubateur à 37 °C en atmosphère humide sous 5 % de CO₂. Le milieu est changé tous les 3 jours. Lorsque la confluence atteint environ 90 %, les cellules sont décollées de la flasque avec de la trypsine-EDTA à 2,5 %. Le décollement des cellules par la trypsine-EDTA s'appelle subculture ou passage. Tout d'abord, les cellules qui ont adhéré dans la flasque sont rincées avec 10 ml de PBS (Invitrogen) afin d'éliminer toutes traces du milieu de culture risquant d'inhiber la trypsine. Après avoir éliminé le PBS, 2 ml de trypsine-EDTA (Invitrogen) sont ajoutés sur le tapis cellulaire et laissés 5 min à l'incubateur. La trypsine est inhibée par l'ajout de 8 ml de milieu de culture. Les cellules sont ensuite marquées au bleu trypan (Invitrogen) et

comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 300 G durant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture à la concentration désirée pour l'ensemencement. La nouvelle suspension cellulaire est enfinensemencée en flasque de 75 cm² (1000 MG-63/cm², 5000 Hob/cm², 4000 hCSM/cm²) afin de continuer la culture cellulaire, ou bien dans des puits contenant les membranes.

2.2. Observation du comportement cellulaire au MEB

➤ *Matériel et réactifs*

- Échantillons ensemencés fonctionnalisés ou non-fonctionnalisés
- Emporte-pièce de 5 mm de diamètre (Biopsy punch, Stiefel®, Afrique du Sud)
- Porte-échantillons (Euromedex, France)
- Ruban adhésif conducteur double face
- Métalliseur Cressington 108auto/SE (ELOISE SARL, France)
- Mini-SEM Hitachi TM-1000
- Tampon phosphate salin (PBS)
- Glutaraldéhyde 2,5 % (Euromedex, France)
- Tétroxyde d'osmium 1 % (Euromedex, France)
- Éthanol 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 100 % (VWR, France)
- Hexaméthylidisilazane (HMDS) (Euromedex, France)

➤ *Méthode*

Après culture cellulaire *in vitro* durant 1, 3, 7 ou 14 jours, les échantillons de membranes fines ou d'implants 3D ensemencés sont fixés, déshydratés, séchés et métallisés avant d'être observés au MEB.

Les échantillons sont rincés 2 fois au PBS, puis fixés à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde diluée à 2,5 % dans du PBS pendant 2h à 37 °C. Afin d'éliminer toutes traces de glutaraldéhyde, les échantillons sont rincés 3 fois avec du PBS. Afin de préserver au mieux la morphologie cellulaire, une fixation au tétr oxyde d'osmium 1 % pendant 1 h à température ambiante est effectuée. 3 rinçages sont ensuite nécessaires afin d'éliminer les résidus de tétr oxyde d'osmium. Puis, les échantillons sont déshydratés par bains successifs d'éthanol à concentration croissante : 25 %, 50 %, 75 %, 90 % et enfin 100 %, les bains durent chacun 20 min. L'éthanol à 100 % est ensuite remplacé par une solution de HMDS 100 % durant 3 min puis les échantillons sont séchés sous dessiccateur pendant 30 min.

Chaque échantillon est collé sur un porte-échantillons à l'aide d'un ruban conducteur carboné double face. Les échantillons sont ensuite métallisés par pulvérisation d'une couche or/palladium cathodique sous argon à l'aide d'un métalliseur Cressington 108auto/SE. Après la métallisation, les échantillons sont laissés 1 h sous vide.

L'observation de l'ensemble des échantillons fixés est effectuée à l'aide d'un microscope électronique à balayage XL-ESEM, Philips.

2.3. Suivi de l'évolution de la prolifération et de l'activité cellulaire

➤ Matériel et réactifs

- Milieu DMEM supplémenté
- alamarBlue® (Thermo Scientific, France)
- Échantillons ensemencés fonctionnalisés ou non-fonctionnalisés
- Multiskan FC (Thermo Scientific, France)

➤ Principe

L'alamarBlue® incorpore un indicateur de croissance colorimétrique basé sur la détection de l'activité métabolique des cellules. Il permet de mesurer cette activité métabolique et d'observer l'évolution de la prolifération cellulaire et de conclure sur la cytotoxicité des échantillons testés. C'est un test non destructif pouvant être utilisé plusieurs fois sur les mêmes cellules sans en affecter la croissance. Ainsi, il permet le suivi de la prolifération cellulaire dans le temps. La mesure met en jeu un indicateur d'oxydo-réduction qui change de couleur en réponse à la réduction chimique ayant lieu lors de la respiration cellulaire. On peut alors mesurer quantitativement la prolifération cellulaire par une mesure de l'absorbance du milieu réduit ou non. La mesure de la viabilité cellulaire est donc basée sur le taux d'oxydo-réduction de l'alamarBlue® déterminé par la mesure de l'absorbance à 570 nm (composé réduit) et à 630 nm (composé oxydé).

➤ *Méthode*

Les échantillons préalablementensemencés dans une plaque de 48 puits sont testés successivement à l'AlamarBlue® 3 jours, 7 jours, 14 jours, et 21 jours après l'ensemencement. Afin d'effectuer le test, l'AlamarBlue® est dilué à 10 % à l'abri de la lumière dans du milieu de culture DMEM supplémenté, puis préchauffé 15 min à 37 °C. Chaque échantillon est alors incubé dans 500 µL de cette solution à 37 °C pendant 4 h. Des puits témoins sont aussi testés : des puits contenant 500 µL de milieu seul sans cellules et des puits contenant un échantillon non ensemencé et 500 µL d'AlamarBlue® dilué. Après 4 h d'incubation, 200 µL de milieu sont prélevés de chaque puits et transféré dans une plaque de 96 puits. Les expériences sont effectuées en triplicats. L'absorbance est lue à deux longueurs d'onde différentes (570 nm et 630 nm) par un spectrophotomètre Multiskan FC.

Les données sont ensuite recueillies et traitées à l'aide des logiciels Excel et GraphPad. Le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue est calculé en fonction de l'équation :

$$\%_{\text{red}} = [(A_{570} - A'_{570}) - R_o(A_{630} - A'_{630})] \times 100$$

$$\text{avec } R_o = \frac{A_{570}^{\text{AB}} - A'_{570}}{A_{630}^{\text{AB}} - A'_{630}}$$

Avec A_{570} et A_{630} respectivement l'absorbance de l'échantillon à 570 nm et 630 nm

A'_{570} A'_{630} l'absorbance du milieu de culture sans cellules respectivement à 570 nm et 630 nm

A_{570}^{AB} et A_{630}^{AB} l'absorbance de l'Alamar Blue dilué à 10 % dans le milieu de culture avec l'échantillon non ensemencé respectivement à 570 nm et 630 nm.

A la fin de chaque test, chaque puits ayant contenu la solution d'AlamarBlue® est rincé 2 fois avec 500 µL de milieu complet préchauffé à 37 °C. Les puits sont ensuite remplis avec 500 µL de milieu complet. La plaque est ensuite laissée dans l'incubateur et le milieu est changé tous les 3 jours.

2.4. Observation de l'expression des protéines osseuses

➤ Matériel et réactifs

- Lames de verre
- Lamelles
- Pincettes
- Milieu de montage (Dako, France)
- Microscope à épifluorescence Leica DM 4000 B
- Échantillons ensemencés fonctionnalisés ou non-fonctionnalisés
- Tampon PBS
- Paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dilué dans du PBS
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, France)
- Albumine de sérum bovin (ou BSA en anglais) (Euromedex, France)
- 4',6'-diamidino-2-phénylindole ou DAPI (200 ng.mL⁻¹, Euromedex, France)
- Phalloïdine (1/300, Alexa fluor® 546, Invitrogen, France)
- Anticorps primaires (**Tableau 3**)
- Anticorps secondaires (**Tableau 4**)

Anticorps Primaires	Concentration utilisée	Espèce d'origine	Espèce cible	Fabricant
Ostéocalcine (V-19)	1:200	lapin	humain	Santa Cruz, sc18319
Ostéopontine (K-20)	1:200	chèvre	humain	Santa Cruz, sc10591
Ostéopontine	1:600	lapin	souris	Abcam, ab63856
BSPII (ID1.2)	1:200	souris	humain	Santa Cruz, sc73497
Green Fluorescent Protein (GFP)	1:500	chèvre	souris	Abcam, ab290

Tableau 3: Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

Anticorps Secondaires	Concentration utilisée	Animal d'origine	Espèce cible	Fabricant
Alexa Fluor® 488	1:200	chèvre	lapin	Invitrogen, A11034
Alexa Fluor® 488	1:200	Âne	chèvre	Invitrogen, A11055
Alexa Fluor® 594	1:500	Âne	lapin	Invitrogen, A21207
Alexa Fluor® 488	1:200	chèvre	souris	Invitrogen, A11001

Tableau 4: Liste des anticorps secondaires correspondant aux anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

➤ *Méthode*

Après culture cellulaire (7 ou 21 jours de culture), les échantillons ensemencés sont rincés 2 fois au PBS. Après rinçage, les échantillons à tester sont fixés au PFA dilué à 4 % (v/v) dans du PBS pendant 1 h à 37 °C. Ils sont ensuite rincés 3 fois au PBS puis incubés avec une solution de perméabilisation et de saturation à 0,1 % (v/v) de triton X-100 et de BSA 1 % (m/v) dans du PBS pendant 45 min à température ambiante. Le triton X-100 perméabilise les cellules et permet l'accessibilité des protéines aux anticorps qui leur sont spécifiques. La BSA permet de saturer les sites aspécifiques de l'anticorps primaire et de minimiser les interactions non spécifiques. Les échantillons sont rincés une fois au PBS, le DAPI est ajouté et incubé pendant 5 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Dans la suite du protocole, les échantillons sont mis à l'abri de la lumière afin de préserver la fluorescence. Après 3 rinçages au PBS, les échantillons sont alors incubés avec de la phalloïdine durant 20 min à température ambiante. Les échantillons sont de nouveau rincés au PBS 3 fois, puis l'anticorps primaire peut alors être incubé pendant 2 h à température ambiante ou toute la nuit à 4 °C. Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois au PBS et incubés avec l'anticorps secondaire à température ambiante durant 1 h dans l'obscurité. Après 3 derniers rinçages au PBS, les échantillons sont soit montés sur lame de verre en utilisant du milieu de montage Dako et recouverts d'une lamelle, soit laissés dans le PBS pour observation. Le milieu de montage permet de conserver la fluorescence.

Les échantillons sont observés avec un microscope à épifluorescence Leica DM 4000 B et l'acquisition des images s'effectue grâce au logiciel Pixia.

2.5. Observation de la minéralisation osseuse

2.5.1. Test du xylénol orange

➤ *Matériel et réactifs*

- Lames de verre, lamelles
- Milieu de montage (Dako, France)
- Microscope à épifluorescence (Leica DM 4000 B)
- Échantillons ensemencés fonctionnalisés ou non-fonctionnalisés
- Xylénol orange (20 µM, Sigma-Aldrich, France)

➤ *Principe*

La minéralisation du tissu peut être mise en évidence par fluorescence grâce au xylénol orange. Le xylénol orange est un chélateur d'ions calciums qui fluoresce dans le rouge. Ce produit est non toxique, il permet une analyse non destructive sur les cellules vivantes (Wang et al., 2006).

➤ *Méthode*

Une fois la culture arrivée à terme (21 jours de culture cellulaire), 1 ml d'une solution de xylénol orange à 20 μ M est ajouté dans chaque puits après avoir été préchauffé à 37 °C. Les échantillons sont alors incubés durant 15 h à 37 °C. Les puits sont ensuite rincés avec du milieu de minéralisation pour éviter la fluorescence non spécifique, puis les échantillons sont montés sur une lame de verre. L'observation s'effectue grâce à un microscope à épifluorescence Leica DM 4000 B et le logiciel Pixia est utilisé pour l'acquisition des images.

2.5.2. Coloration au rouge d'Alizarine➤ *Matériel et réactifs*

- Aimant et agitateur magnétique
- pHmètre
- OCT Compound 4583 (Tissu-TEK® Sakura, Pays-Bas)
- Lame SUPERFROST® PLUS (Thermo Scientific, France)
- Milieu de montage (Dako, France)
- Échantillons ensemencés fonctionnalisés ou non-fonctionnalisés
- Tampon PBS
- Éthanol 70 %
- Eau distillée
- Acide chlorhydrique (HCl) à 1M, hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) à 10 %
- Rouge d'Alizarine (2 g dans 100 mL, Sigma-Aldrich, France)
- Cryostat Jung CM 3000 (Leica, France)
- Microscope optique (Leica DM 4000 b)

➤ *Principe*

Le marquage au rouge d'Alizarine est utilisé pour détecter et quantifier la minéralisation. Ce colorant se lie spécifiquement sur les sels de calcium. Il est utilisé en histochimie minérale du calcium.

➤ *Méthode*

La solution de rouge d'Alizarine est à préparer de préférence quelques heures à l'avance, et peut être conservée 1 mois à l'abri de la lumière à condition de vérifier le pH avant chaque utilisation. La solution est constituée de 2 g de rouge d'Alizarine dissouts dans 100 mL d'eau distillée. Le pH doit être ajusté entre 4,1 et 4,3 à l'aide d'une solution d'hydroxyde d'ammonium à 10 %. L'ajustement du pH est crucial.

Après 21 jours de culture cellulaire, les échantillons sont rincés 2 fois avec du PBS, puis fixés à froid à l'éthanol 70 % durant 1h à -20 °C. À la suite de la fixation, les échantillons sont rincés 3 fois à l'eau distillée puis incubés pendant 20 min avec la solution de rouge d'Alizarine à température ambiante. Puis, les échantillons sont rincés à l'eau distillée jusqu'à ce que le surnageant devienne transparent. Ils sont inclus dans un moule contenant de l'OCT et conservés à -20 °C pendant 4h. Les échantillons sont ensuite placés à -80 °C toute la nuit, puis coupés au cryostat à une température de -20 °C et à une épaisseur de coupe de 40 µm. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre SUPERFROST® PLUS puis montées à l'aide du milieu de montage et observées au microscope. Le logiciel Pixia est utilisé pour l'acquisition des images.

2.5.3. Analyse au Raman confocal

Les analyses au raman confocal ont été effectuées en collaboration avec M.Guy Ladam au Laboratoire de Biophysique et Biomatériaux (La2B).

➤ *Matériel*

- Échantillons ensemencés fonctionnalisés ou non-fonctionnalisés
- Tampon PBS
- PFA à 4 % dilué dans du PBS
- Eau distillée
- Microscope confocal (modèle BX41, Olympus)
- Spectromètre Raman (LabRam HR, Jobin-Yvon Horiba)

➤ *Méthode*

Après 21 jours de culture *in vitro*, les échantillonsensemencés sont rincés 2 fois avec du PBS, puis fixés au PFA dilué à 4 %. Après fixation, ils sont de nouveau rincés avec du PBS, puis à l'eau distillée. Ils sont ensuite séchés délicatement à l'argon avant d'être analysés au Raman confocal. L'appareillage est composé d'un spectromètre Raman couplé à un microscope confocal. L'excitation de l'échantillon a été effectuée par laser hélium-néon à une longueur d'onde de 632,8 nm. Le rayon laser a été concentré à l'aide d'un objectif x50LWD. Afin d'éliminer tout signal des plans non focaux adjacents, des sténopés de 400 μm et de 250 μm de diamètre ont été respectivement utilisés pour l'analyse spectrale à spectre unique et pour la cartographie 2D.

3. Caractérisation *in vivo* des implants nanofibreux

3.1. Préparation des échantillons

Les échantillons sont toujours préparés en conditions stériles ainsi toutes les manipulations sont effectuées sous un poste de sécurité microbiologique de classe II (PSM).

3.1.1. Préparation des membranes fines

➤ *Matériel et réactifs*

- Membranes fines électrospinnées
- Plaques de 96 puits
- Emporte-pièce de 5 mm de diamètre (Biopsy punch, Stiefel®, Afrique du Sud)
- Pincettes stérilisées
- Éthanol 70 %
- Tampon PBS et ou tampon MES
- Solutions de polyélectrolytes

➤ *Méthode*

À l'aide d'un emporte-pièce (5 mm de diamètre), les membranes fines sont découpées, puis placées dans des plaques de 96 puits et stérilisées avec une solution d'éthanol à 70 % pendant 1 h. Les membranes sont ensuite stérilisées sous UV (254 nm, 30 W) pendant 30 min. Après la stérilisation, elles sont rincées 2 fois avec le PBS pour éliminer toute trace d'éthanol. Les membranes sont laissées dans le PBS et placées à 37 °C avant implantation si aucun autre traitement n'est prévu. Si une fonctionnalisation est nécessaire, les membranes sont alors incubées toute la nuit dans du tampon MES à 4 °C. Le dépôt des multicouches s'effectue alors suivant le protocole détaillé dans le paragraphe 1.2.2. Une fois la fonctionnalisation terminée, les membranes sont laissées dans le tampon MES afin d'éviter leur déshydratation. La veille de l'ensemencement cellulaire ou de l'implantation les membranes sont incubées toute la nuit dans du milieu de culture à 37 °C.

3.1.2. Préparation des implants 3D

➤ *Matériel et réactifs*

- Implants 3D électrospinnés
- Plaques de 96 puits
- Lame de rasoir
- Falcon de 50 mL
- Emporte-pièce de 5 mm de diamètre (Biopsy punch, Stiefel®, Afrique du Sud)
- Pincettes stérilisées
- Dessiccateur
- Éthanol 70 %
- Eau stérile
- Tampon PBS et ou tampon MES
- Solutions de polyélectrolytes

➤ *Méthode*

Les implants sont tout d'abord taillés transversalement à l'aide d'une lame de rasoir en tranche de 1 mm d'épaisseur. Puis les échantillons sont soit découpés à l'emporte-pièce (5 mm de diamètre), soit taillés en morceaux de 1 mm de côté. Dans un falcon de 50mL, les implants sont baignés dans l'éthanol et placés sous dessiccateur pendant 1 h. Ensuite l'éthanol est remplacé par de l'eau stérile et les échantillons sont de nouveau placés sous dessiccateur durant 1 h. Après infiltration de l'eau dans la structure poreuse des implants, ceux-ci sont placés dans des plaques de 96 puits avec de l'eau stérile et stérilisés aux UV (254 nm, 30 W) pendant 30 min. Après la stérilisation, l'eau est remplacée par du PBS stérile et les membranes sont placées à 37 °C avant implantation si aucun autre traitement n'est prévu. Si une fonctionnalisation ou un ensemencement sont prévus, la méthode est la même que celle mentionnée précédemment pour les membranes fines.

3.2. Expérimentation animale chez le modèle murin

Les expérimentations animales sont effectuées chez le modèle murin, sur des souris mâles « nude » immunodéficientes, sur des souris ICR (Imprinting Control Region) consanguines albinos, ou encore sur des souris GFP (Green Fluorescent Protein). Deux sites d'implantations différents ont été utilisés : un site non-osseux (sous-cutané), et un site osseux (calvaria). Les

implantations ont d'abord été réalisées en site non osseux. Ce modèle d'implantation nécessite un apport cellulaire pour permettre la régénération osseuse, les implants utilisés sont préalablement ensemencés avec des cellules osseuses avant l'implantation. Ces membranes sont placées directement entre la peau et le muscle sur le dos des souris.

En site osseux aucun apport cellulaire n'est normalement nécessaire puisque le recrutement cellulaire s'effectue au niveau du site de l'implantation. Les implants sont placés en site calvaria (crâne de la souris).

Toutes les procédures de notre étude, de soins, d'élevage, d'anesthésie et de chirurgie au sein de l'animalerie sur les animaux sont en conformité avec le projet n°01716.01 «Développement de biomatériaux actifs pour la médecine régénérative osseuse et cartilagineuse» soumis au Cremeas. Les protocoles du projet ont été conçus et conduits selon la réglementation en cours du code rural et les règles de Bioéthique.

3.2.1. Implantations sous-cutanées chez la souris Nude

Les souris utilisées pour les implantations sous-cutanées sont des souris mâles « nude » de la lignée SWISS âgées de 5 semaines à leur arrivée à l'animalerie. Elles ont été fournies par Janvier Lab et acclimatées pendant une semaine dans l'animalerie avant l'expérimentation.

➤ *Matériel et réactifs*

- Matériel de chirurgie : pinces, ciseaux, scalpels, lames, fils de suture Safil® 6/0 (B Braun, France)
- Aiguilles
- Seringues de 1 mL
- Implants nanofibreux préparés
- Éthanol 70 %
- Kétamine 500 (2 mL.kg⁻¹, Virbac France, France)
- Xylazine (Rompun 2 %) (0,5 mL.kg⁻¹, Bayer Healthcare, France)

➤ *Méthode*

Après avoir été acclimatées durant une semaine à l'animalerie, les souris mâles âgées de 6 semaines sont implantées en sous-cutané avec les échantillons préparés comme décrit précédemment. Les instruments sont lavés et stérilisés en début et en fin de chirurgie.

Les souris sont pesées, puis anesthésiées par injection intrapéritonéale à raison d'une dose de 10 mL.kg^{-1} d'un mélange de kétamine et xylazine dilué dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite positionnées en décubitus ventral pour toute la durée de la chirurgie. Des incisions dorsales de 4 mm sont pratiquées, la peau est ensuite séparée des muscles dorsaux, et les échantillons sont insérés entre la peau et les muscles (**Figure 22**). La partieensemencée de cellules de l'échantillon est dirigée vers la peau quand cela est possible. En vertu de la règle des 3R, 6 échantillons peuvent être implantés en sous-cutané sur une même souris. Les sutures sont réalisées à l'aide d'un fil résorbable. Les souris sont laissées sur une table chauffante après la chirurgie durant la phase de réveil. Leur poids et leur état général sont ensuite suivis régulièrement durant toute la durée de l'expérimentation jusqu'au jour de l'explantation des implants.



Figure 22: Implantation des membranes fines en sous-cutané chez la souris Nude

3.2.2. Implantations en calvaria chez les souris Nude, ICR et GFP

Les souris utilisées pour les implantations en calvaria d'implantsensemencés de cellules sont des souris mâles « nude » de la lignée SWISS âgées de 4 semaines à leur arrivée à l'animalerie. Elles ont été fournies par Janvier Lab et acclimatées pendant une semaine dans l'animalerie avant l'expérimentation. Pour les implantations d'échantillons non cellularisés, des

souris ICR et GFP consanguines et albinos provenant de l'élevage de l'animalerie ont été utilisées. Les souris ICR et GFP utilisées sont des souris mâles âgées de 5 à 7 semaines.

➤ *Matériel et réactifs*

- Matériel de chirurgie : pinces, ciseaux, scalpels, lames, fils de suture Safil® 6/0 (B Braun, France)
- Micromoteur SUNI™ (20 000 trs/min, Satelec®, France) (**Figure 22 A**)
- Contre-angle bague bleue (**Figure 22 B**)
- Fraise boule multilames carbure de tungstène (1,8 mm) (**Figure 22 B**)
- Trépan osseux (4 mm) (**Figure 22 B**)
- Aiguilles
- Seringues de 1 mL
- Implants nanofibreux préparés
- Éthanol 70 %
- PBS stérile
- Kétamine 500 (2 mL.kg⁻¹, Virbac France, France)
- Xylazine (Rompun 2 %) (0,5 mL.kg⁻¹, Bayer Healthcare, France)

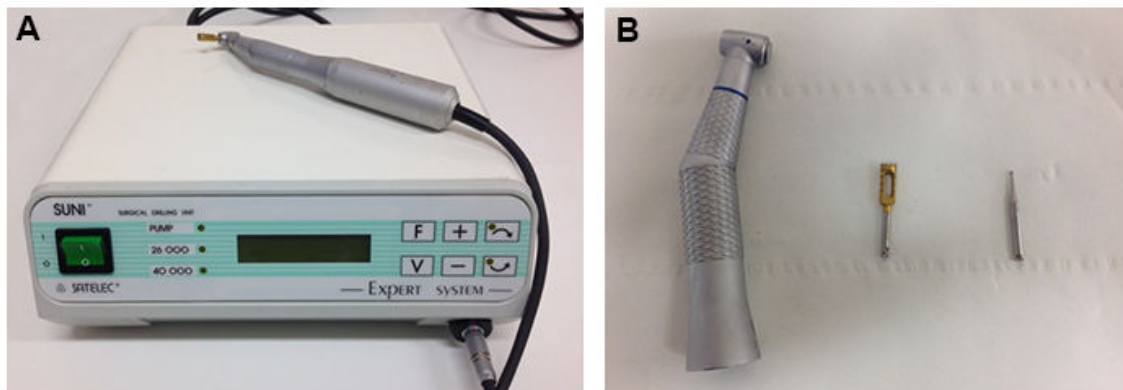


Figure 23: Micromoteur SUNI™ et trépan osseux et contre-angle adaptés (A). De gauche à droite : contre-angle bague bleue, trépan osseux, fraise boule (B).

➤ *Méthode*

Après avoir été acclimatées durant une semaine à l'animalerie, les souris mâles nues âgées de 5 semaines sont implantées en calvaria avec les échantillons préparés comme décrit précédemment. Il en est de même pour les souris ICR âgées de 5 à 7 semaines. Les instruments sont lavés et stérilisés en début et fin de chirurgie. Du matériel dentaire est utilisé pour la chirurgie, il est constitué d'un micromoteur (**Figure 23 A**) doté d'un contre-angle sur lequel est adapté une fraise boule ou un trépan osseux (**Figure 23 B**).

Les souris sont pesées, puis anesthésiées par injection intrapéritonéale à raison d'une dose de 10 mg.kg^{-1} d'un mélange de kétamine et xylazine dilué dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite positionnées en décubitus ventral pour toute la durée de la chirurgie. Une incision de 2,5 à 3 cm est pratiquée au centre du crâne. Pour une lésion de petite taille, une lésion mécanique de 2 mm de diamètre (**Figure 24 A**) est effectuée en utilisant du matériel dentaire (fraise boule de 1,8 mm de diamètre) (**Figure 23 B**).

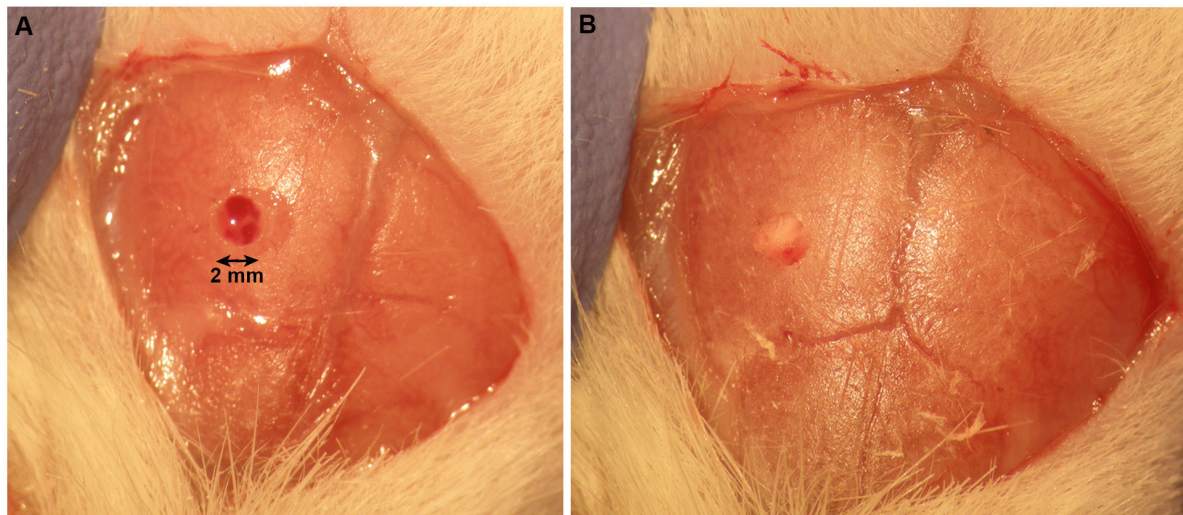


Figure 24: Lésion de petite taille (A) comblée par un implant 3D (B) en calvaria chez la souris ICR

Pour une lésion de grande taille (5 mm de diamètre) (**Figure 25 A**), le trépan osseux doit être utilisé afin de marquer la zone à abraser, la fraise boule est ensuite utilisée afin d'abraser la zone précédemment délimitée (**Figure 25 A**). Une irrigation régulière du site de l'implantation est nécessaire durant toute la chirurgie.

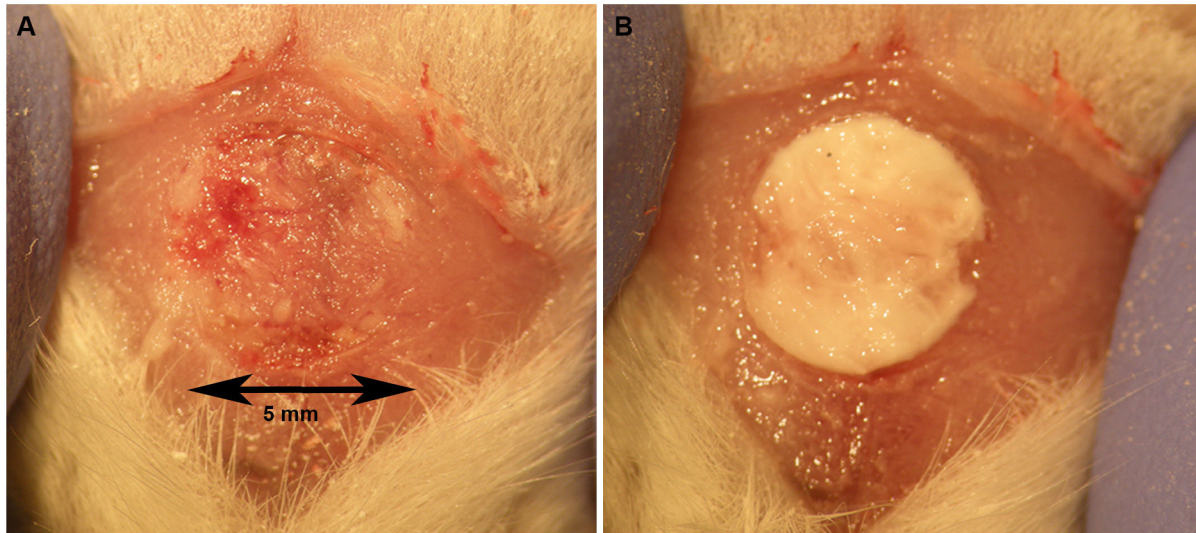


Figure 25: Lésion de grande taille (A) recouverte par un implant 3D (B) en calvaria chez la souris ICR

L'implant est inséré au niveau de la lésion osseuse (**Figure 24 B et 25 B**). En vertu de la règle des 3R, deux lésions osseuses de petite taille peuvent être réalisées en calvaria sur une même souris, mais seule une lésion de grande taille peut être réalisée par souris. Les sutures sont réalisées à l'aide d'un fil résorbable. Les souris sont laissées sur une table chauffante après la chirurgie durant la phase de réveil. Leur poids et leur état général sont ensuite suivis régulièrement durant toute la durée de l'expérimentation jusqu'au jour de l'explantation des implants.

3.2.3. Explantation des échantillons

L'explantation des membranes et la mise à mort des animaux ont été réalisées en respectant les protocoles d'expérimentation animale.

➤ *Matériel et réactifs*

- Matériel de chirurgie : pinces, ciseaux, scalpels, lames
- Aiguilles
- Seringues de 1 mL
- PBS stérile
- Éthanol 70 %
- Solution de PFA 4 %
- Solution de Bouin Hollande
- Pentobarbital sodique (54,7 mg.mL⁻¹, Ceva Santé Animale, France)

➤ *Méthode*

Différents temps d'implantations ont été expérimentés : 2 semaines, 4 semaines, et 6 semaines. Pour cela, les souris ont été mises à mort par injection en intrapéritonéale de doses létales de pentobarbital sodique.

Explantation des implants sous-cutanés

Les souris sont positionnées en décubitus ventral. La peau est incisée à la base de la nuque ainsi que latéralement afin de former un lambeau dorsal, celui-ci est ensuite retourné afin de repérer et récupérer les implants.

Explantation des implants calvaria

Les souris sont positionnées en décubitus ventral. La peau est incisée au centre du crâne afin de rendre visible toute la surface osseuse. L'os est soigneusement disséqué en suivant les contours du crâne afin d'éviter toute fracture. Une zone osseuse est préservée autour de l'implant lors de la récupération des échantillons afin de faciliter l'analyse des résultats (**Figure 26**).

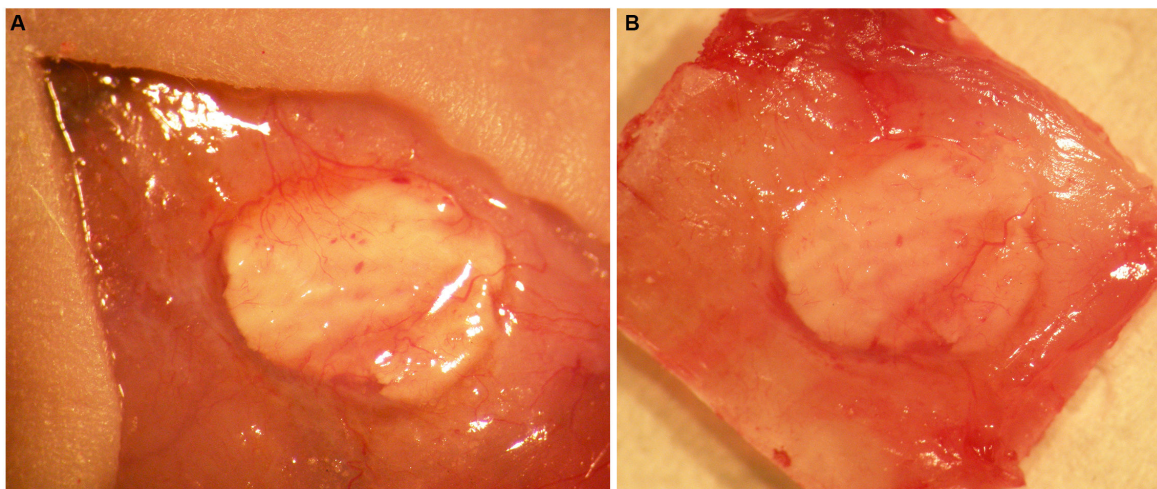


Figure 26: Images de l'implant 3D après 4 semaines d'implantation en calvaria chez une souris Nude (A). Une zone osseuse est préservée tout autour de l'implant lors de l'explantation (B).

Tous les implants récupérés sont ensuite rincés dans une solution de PBS, puis fixés à l'aide d'une solution de Bouin Hollande pour une analyse histologique ultérieure ou bien à l'aide d'une solution de PFA 4 % pour d'autres tests.

Les échantillons explantés vont ainsi suivre différentes procédures d'analyse afin de vérifier l'induction et la régénération osseuse *in vivo*.

3.3. Observation de l'expression des protéines osseuses après implantation

➤ Matériel et réactifs

- Lames SUPERFROST® PLUS (Thermo Scientifique, France)
- Moules d'inclusion
- Milieu de montage (Dako, France)
- Microscope à épifluorescence Leica DM 4000 B
- Cryostat Jung CM 3000 (Leica, France)
- Implants sous-cutanés ou calvaria
- OCT Compound 4583 (Tissu-TEK® Sakura, Pays-Bas)
- Tampon PBS
- PFA à 4% dilué dans du PBS
- Triton X-100 (Sigma-aldrich, France)
- Albumine de sérum bovin (ou BSA en anglais) (Euromedex, France)
- 4',6'-diamidino-2-phénylindole ou DAPI (200 ng.mL⁻¹, Euromedex, France)
- Phalloïdine (1/300, Alexa fluor® 546, Invitrogen, France)
- Anticorps primaires (**Tableau 3**)
- Anticorps secondaires (**Tableau 4**)

➤ Méthode

Après explantation, les implants à tester sont fixés au PFA dilué à 4 % (v/v) dans du PBS toute la nuit à 4 °C. Ils sont ensuite rincés 3 fois au PBS, puis placés dans des moules siliconés et inclus en OCT pendant 4 h à -20 °C, puis toute la nuit à -80 °C. Les implants inclus sont ensuite démoulés et coupés au cryostat à une température de -27 °C. Les coupes de 25 à 30 µm d'épaisseur sont déposées sur des lames de verres SUPERFROST® PLUS, puis elles sont laissées à sécher toute la nuit. Le traitement des coupes est ensuite le même que décrit précédemment (II.4. Observation des protéines osseuses). A la fin du traitement, les lames sont montées en utilisant du milieu de montage Dako et recouvertes d'une lamelle. Les échantillons sont observés avec un microscope à épifluorescence Leica DM 4000 B et l'acquisition des images s'effectue grâce au logiciel Pixia.

3.4. Observation histologique de synthèse matricielle *in vivo*

➤ *Matériel et réactifs*

- Milieu de montage Histolaque (Labo-Moderne, France)
- Microscope optique Leica DM 4000 B
- Implants sous-cutanés ou calvaria
- EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) (Euromedex, France)
- Solution de Bouin Hollande
- Colorant Mallory

➤ *Méthode*

Après explantation, les implants à tester sont fixés à l'aide d'une solution de Bouin Hollande durant 2 jours à température ambiante. Ils sont ensuite déminéralisés grâce à une solution d'EDTA dilué à 15 % dans du PBS durant une semaine à 4 °C sous agitation. À la suite de la déminéralisation, les implants sont inclus en paraffine, puis démoulés et coupés au microtome. Les coupes de 7 µm d'épaisseur sont déposées sur des lames de verres, déparaffinées et colorées au Mallory. À la fin du traitement, les coupes sont montées en utilisant du milieu de montage Histolaque et recouvertes d'une lamelle. Les échantillons sont observés avec un microscope Leica DM 4000 B et l'acquisition des images s'effectue grâce au logiciel Pixia.

3.5. Analyse de la minéralisation *in vivo*

3.5.1. Analyse par Raman confocal

Les analyses au raman confocal ont été effectuées en collaboration avec M.Guy Ladam au Laboratoire de Biophysique et Biomatériaux (La2B).

➤ *Matériel*

- Implants calvaria
- Tampon PBS
- Paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dilué dans du PBS

- Eau distillée
- Microscope confocal (modèle BX41, Olympus)
- Spectromètre Raman (LabRam HR, Jobin-Yvon Horiba)

➤ *Méthode*

Après explantation, les échantillons sont rincés 2 fois au PBS, puis fixés au PFA dilué à 4 %. Après fixation, ils sont de nouveau rincés au PBS, puis à l'eau distillée. Ils sont ensuite séchés délicatement à l'argon avant d'être analysés au Raman confocal. L'appareillage est composé d'un spectromètre Raman couplé à un microscope confocal. L'excitation de l'échantillon a été effectuée par laser hélium-néon à une longueur d'onde de 632,8 nm. Le rayon laser a été concentré à l'aide d'un objectif x50LWD. Afin d'éliminer tout signal des plans non focaux adjacents, des sténopés de 400 µm et de 250 µm de diamètre ont été respectivement utilisés pour l'analyse spectrale à spectre unique et pour la cartographie 2D.

3.5.2. Imagerie par MEB-spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie

Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec M.Manuel Arruebo à l'INA (Instituto de Nanociencia de Aragon) de Saragosse.

➤ *Matériel et réactifs*

- Implants calvaria
- Lames SUPERFROST® PLUS (Thermo Scientifique, France)
- Moule d'inclusion
- Milieu de montage (Dako, France)
- Cryostat Jung CM 3000 (Leica, France)
- OCT Compound 4583 (Tissu-TEK® Sakura, Pays-Bas)
- Tampon PBS
- PFA à 4 % dilué dans du PBS
- MEB (Inspect™ F50, FEI, USA) couplé à un spectromètre à rayons X à énergie dispersive

➤ *Méthode*

Après explantation, les implants à tester sont fixés au PFA dilué à 4 % (v/v) dans du PBS toute la nuit à 4 °C. Ils sont ensuite rincés 3 fois au PBS, puis placés dans des moules siliconés et

inclus en OCT pendant 4 h à -20 °C, puis toute la nuit à -80 °C. Les implants inclus sont ensuite démoulés et coupés au cryostat à une température de -27 °C. Les coupes de 25 à 30 µm d'épaisseur sont déposées sur des lames de verres SUPERFROST® PLUS, puis elles sont laissées à sécher toute la nuit. Les coupes sont ensuite rincées deux fois à l'eau distillée afin d'éliminer toute trace d'OCT. Elles sont ensuite métallisées par pulvérisation d'une couche de platine avant d'être observées.

L'observation et l'analyse de la composition des échantillons ont été effectuées par microscopie électronique à balayage couplé à un spectromètre à rayon X à dispersion d'énergie (SEM-EDS X-ray spectroscopy en anglais). Ce système permet la cartographie de la composition chimique des coupes observées à une distance de 10 mm sous une tension de 10 kV.

3.6. Observation du remodelage osseux

3.6.1. Injection pré-explantatoire de la calcéine

➤ *Matériel et réactifs*

- Pincettes
- Aiguilles
- Seringues de 1 mL
- Système de contention
- Éthanol 70 %
- Solution de calcéine (1 mg.mL⁻¹, Sigma Aldrich)

➤ *Méthode*

Deux injections de calcéine sont nécessaires afin de pouvoir observer le tissu osseux remodelé *post mortem*. Ces deux injections doivent être réalisées une semaine, puis trois jours avant la date d'explantation. Les souris sont introduites dans le système de contention et positionnées en décubitus ventral. Elles sont traitées par injection sous-cutanée de calcéine (10 mg.kg⁻¹) au niveau de la zone d'implantation. Elles sont ensuite libérées du système de

contention et replacées dans leur cage. Leur état général est ensuite suivi régulièrement jusqu'au jour de l'explantation.

3.6.2. Traitement post-explantatoire

➤ *Matériel et réactifs*

- Lames SUPERFROST® PLUS (Thermo Scientifique)
- Moule d'inclusion
- Milieu de montage (Dako, France)
- Microscope à épifluorescence Leica DM 4000 B
- Cryostat Jung CM 3000 (Leica, France)
- Implants calvaria
- OCT Compound 4583 (Tissu-TEK® Sakura, Pays-Bas)
- Tampon PBS
- PFA à 4 % dilué dans du PBS
- 4',6'-diamidino-2-phénylindole ou DAPI (200 ng.mL⁻¹, Euromedex, France)

➤ *Méthode*

Après explantation, les implants à tester sont fixés au PFA dilué à 4 % (v/v) dans du PBS toute la nuit à 4 °C. Ils sont ensuite rincés 3 fois au PBS, puis placés dans des moules siliconés et inclus en OCT pendant 4 h à -20 °C, puis toute la nuit à -80 °C. Les implants inclus sont ensuite démoulés et coupés au cryostat à une température de -27 °C en évitant tout contact avec une lumière directe. Les coupes de 25 à 30 µm d'épaisseur sont déposées sur des lames de verres SUPERFROST® PLUS, puis elles sont laissées à sécher toute la nuit à l'abri de la lumière. Enfin, les échantillons sont rincés une fois au PBS, puis le DAPI est ajouté et incubé pendant 5 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 3 rinçages au PBS, les lames sont montées en utilisant du milieu de montage Dako et recouvertes d'une lamelle.

Les échantillons sont observés avec un microscope à épifluorescence Leica DM 4000 B et l'acquisition des images s'effectue grâce au logiciel Pixia.

3.7. Mesure des propriétés mécaniques

Les mesures mécaniques et leur analyse ont été effectuées en collaboration avec M. Leandro Jacomine à l'ICS (Institut Charles Sadron) au sein de l'équipe PMTP (Physique-Mécanique et Tribologie des Polymères).

➤ *Matériel et réactifs*

- Implants calvaria
- Nanoindenteur, pointe de Berkovich
- Salicylate de phényle (Salol, Sigma Aldrich, France)
- Tampon PBS
- Solution de PFA 4 %

➤ *Méthode*

Après explantation, les implants calvaria à tester sont fixés au PFA 4 % (v/v) toute la nuit à 4 °C, puis rincés 3 fois au PBS, et enfin déshydratés par bains successifs d'éthanol (20 min) de concentration croissante : 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, et 100 %. Une fois séchés, les échantillons sont fixés grâce au Salol sur une lame de verre avant indentation. Une pointe de Berkovich adaptée au nanoindenteur a été utilisée. La nanoindentation a été réalisée sous forme de cycles de trois étapes: charge, palier, décharge. La charge initiale est appliquée de façon linéaire jusqu'à l'obtention de la charge maximale. La charge est ensuite maintenue constante (palier), puis survient l'étape de la décharge durant laquelle les propriétés mécaniques sont mesurées. La méthode Oliver et Pharr (Qianhua et al., 2013) a été utilisée afin d'analyser les résultats et de caractériser les échantillons. La charge maximale est comprise entre 5 mN et 60 mN (croissance quadratique). Les temps de charge et de décharge sont de 30 s et la durée du palier est de 50 s. D'autre part, au moins 10 cycles d'indentation ont été réalisés en différents points dans la même zone de travail en augmentant progressivement la valeur de la charge. Ceci a été réalisé afin de pouvoir observer les modifications des propriétés mécaniques de l'échantillon en fonction de la profondeur de pénétration. Enfin, chaque cycle d'indentation de la même zone a été effectué à 5 s d'intervalle. Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Excel.

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1

Implants de collagène équipés de nanoréservoirs actifs pour la régénération osseuse

- Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Fioretti F, Ladam G & Benkirane-Jessel N (2013). Collagen implants equipped by “fishscale”- like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine*. doi:10.2217/nnm.13.122

1.1. Contexte et objectifs

Le tissu osseux est un tissu capable de se régénérer à la suite de traumatismes causant des dommages partiels. Cependant, cette capacité régénérative reste limitée lorsque le volume osseux perdu devient critique à la suite de traumatismes extrêmement graves ou de grandes résections tumorales. Les traitements actuels recommandent toujours les greffes osseuses comme le « gold standard », cependant de nombreux inconvénients, notamment liés au nombre limité de donneurs, existent. Un besoin clinique croissant de développer des solutions alternatives aux greffes osseuses est évident. Des biomatériaux permettant une régénération osseuse durable et rapide sont nécessaires afin de réduire les temps de guérison mais aussi les risques de complications postopératoires des patients. Pour cela, les recherches en matière de nanomédecine régénérative, ont récemment été consacrées à développer des technologies visant la libération contrôlée de molécules thérapeutiques (Caruthers et al., 2007; Santo et al., 2012). Ces avancées technologiques pourraient améliorer la qualité de vie des patients, accroître la durée de vie, mais également réduire considérablement les coûts des soins médicaux. Une technologie reposant sur la technique des films multicouches de polyélectrolytes, ou « Layer-by-Layer » (LBL) en anglais, a permis d'incorporer des molécules actives tels que des médicaments ou encore des facteurs de croissance au sein de nanoréservoirs. L'incorporation de telles substances a pour but de fonctionnaliser une membrane nanofibreuse et ainsi d'améliorer ses propriétés en la rendant bioactive (Berth et al., 2002; Jessel et al., 2003; Benkirane-Jessel et al., 2005; Dierich et al., 2007; Choi et al., 2012; Mendoza-Palomares et al., 2012).

Aujourd'hui, la membrane « Bio-Gide® » commercialisée par Geistlich est fréquemment utilisée en clinique dans le domaine de la régénération osseuse et tissulaire guidée. L'efficacité de cette membrane à base de collagène d'origine animale repose sur sa structure particulière permettant une excellente intégration des tissus lors de l'implantation (Rothamel et al., 2004; Schwarz et al., 2008).

L'objectif de cette étude était d'appliquer notre stratégie de fonctionnalisation de nanoréservoirs bioactifs à un support commercial déjà existant sur le marché. Ayant pour objectif une application clinique, nous avons utilisé uniquement des produits approuvés par des autorités de santé comme la FDA (US Food and Drug Administration) afin de rendre ces membranes bioactives. La membrane choisie durant notre étude, « Bio-Gide® », a été fonctionnalisée de

nanoréservoirs à base de chitosane (CHI) et de BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2). Afin de fonctionnaliser cette membrane et d'améliorer ses performances en terme de régénération osseuse, nous avons choisi une architecture de 6 bicouches : (CHI/BMP-2)₆, comme nanoréservoirs actifs.

1.2. Résultats et discussion

Dans un premier temps, la construction des nanoréservoirs (CHI/BMP-2)₆ a été vérifiée par QCM-D (Quartz microbalance). La construction des bicouches (CHI/BMP-2) a été observée sur 6 cycles et suit un régime de croissance linéaire. La quantité moyenne de BMP-2 incorporée a été estimée à 0,73 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$. D'autre part, la fonctionnalisation des membrane Bio-Gide® ainsi que la morphologie des nanoréservoirs a été confirmée au microscope électronique à balayage (MEB). Ainsi, les fibres de collagène fonctionnalisées sont uniformément enrobées de nanoréservoirs présentant une morphologie écaillée principalement due à la nature polysaccharidique du chitosane.

Afin de tester la capacité des membranes de collagène fonctionnalisées à induire une différenciation ostéogénique *in vitro*, un suivi de la prolifération et de l'activité cellulaire a tout d'abord été effectué sur 21 jours. Ce test a montré que la fonctionnalisation n'avait aucun effet négatif sur les ostéoblastes et que ceux-ci proliféraient et présentaient une activité métabolique similaire sur la membrane non fonctionnalisée. D'autre part, l'expression de l'ostéopontine a été mise en évidence par immuno-marquage, le marquage fluorescent du Xylenol orange et une coloration au rouge d'Alizarine ont permis de mettre en évidence la minéralisation des ostéoblastes induite par les membranes après 21 jours de culture cellulaire. Les résultats montrent une augmentation de 23 % de la minéralisation induite par la membrane fonctionnalisée en comparaison de la membrane non fonctionnalisée. L'incorporation de la BMP-2 dans les nanoréservoirs semble permettre la protection mais également l'accès de la molécule aux ostéoblastes engendrant ainsi une accélération de la minéralisation de la matrice extracellulaire.

Après des analyses histologiques et des analyses par Raman confocal, les résultats *in vivo* confirment l'étude *in vitro* par des implantations des échantillons à base de collagène incorporés

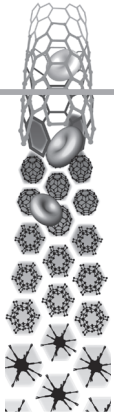
de nanoréservoirs bioactifs, en calvaria chez la souris Nude durant 6 semaines. Les résultats montrent clairement une accélération de la régénération osseuse grâce à la membrane commerciale dotée de nanoréservoirs de BMP-2.

1.3. Conclusion

Notre stratégie innovante permet l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de membranes déjà commercialisées. Notre technologie permet également la protection de la molécule active fragile (facteur de croissance) par le biais de nanoréservoirs à base de chitosane. Récemment, de nouvelles thérapeutiques basées sur les nanotechnologies offrent la possibilité de révolutionner la pratique de la médecine. Toutefois, afin de profiter pleinement du potentiel que la nanomédecine nous offre, il est aujourd'hui nécessaire de trouver des solutions afin de réduire les coûts et d'obtenir les autorisations cliniques nécessaires.

Notre implant à base de collagène et doté de nanoréservoirs de BMPs présente des propriétés régénératives améliorées. Cependant, son origine xénogénique accompagnée des risques qu'elle entraîne nous a conduit à développer une membrane synthétique afin de remplacer ces implants d'origine animale. Nous nous proposons de développer de nouveaux implants plus efficaces pour la nanomédecine et à moindre coût.

Les travaux développés par la suite portent sur le développement de structures synthétiques biomimétiques et nanofibreuses appelées « membrane fine » et « implant 3D ».



For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Collagen implants equipped with 'fish scale'-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration

Implants triggering rapid, robust and durable tissue regeneration are needed to shorten recovery times and decrease risks of postoperative complications for patients. Here, we describe active living collagen implants with highly promising bone regenerative properties. Bioactivity of the implants is obtained through the protective and stabilizing layer-by-layer immobilization of a protein growth factor in association with a polysaccharide (chitosan), within the form of nanocontainers decorating the collagen nanofibers. All components of the implants are US FDA approved. From both *in vitro* and *in vivo* evaluations, the sophisticated strategy described here should enhance, at a reduced cost, the safety and efficacy of the therapeutic implants in terms of large bone defects repair compared with current simplistic approaches based on the soaking of the implants with protein growth factor.

KEYWORDS: ■ bone morphogenetic protein 2 ■ bone regeneration ■ collagen implant ■ drug delivery ■ layer-by-layer deposition ■ regenerative nanomedicine

Bone has a capacity to regenerate after suffering partial damage. However, this regeneration becomes difficult when a serious break or tumor lesion occurs and the loss of tissue is substantial. Today, these cases are treated with various grafts with a number of disadvantages, such as limitations with donors. There is a demonstrated clinical need for alternatives of autologous fresh bone graft with excellent biological performance. Smart nanoengineered materials allow novel therapeutic modalities such as improved specific cell targeting by means of nanoparticle-based drugs, resulting in a decreased side effects for patients. Recently, nanomedicine has taken issue for drug delivery, gene delivery and regenerative medicine [1–4]. Other advances are being made in sophisticated biomaterials for use in less invasive surgical implantations, leading to shorter recovery times and decreased risk of postoperative infections or other complications. Such innovations will improve the quality of life, extend life expectancies and should reduce the overall cost of healthcare.

Biomaterials also play central roles in modern strategies in regenerative medicine and tissue engineering as designable biophysical and biochemical milieus that direct cellular behavior and function. Tissue engineering is an interdisciplinary field that has attempted to implement a variety of processing methods for synthetic and natural polymers to fabricate tissue and organ regeneration scaffolds. Such materials should provide provisional 3D supports to interact with cells in ways that control their function

by guiding the spatially and temporally complex multicellular processes of tissue formation and regeneration [5–12]. The guidance provided by biomaterials may facilitate restoration of structure and function of damaged or dysfunctional tissues.

Several biomimicking medical devices for regenerative medicine have been inspired by the intricate fibrillar architecture of natural extracellular matrix (ECM) components [13]. Such matrices have already shown remarkable success in tissue-engineering applications [8,14], examples of which include reconstruction of a dog urinary bladder [13] and the regeneration after brain injury in a mouse stroke model [15]. However, it has been established that inert ECM mimetic scaffolds are not efficient at generating durable tissue repair. Therefore, there is a need for materials that ensure the sustained release of active compounds. To this end, recent advances in nanotechnology have led to various engineered ECM analogs and biomaterials incorporated with active compounds (drugs, genes or growth factors) within the form of layer-by-layer (LbL) coatings built-up from oppositely charged macromolecules [16–32].

As considerable effort is currently devoted to the design of nanostructured functional materials, ultrathin polyelectrolyte multilayer (PEM) coatings built-up from oppositely charged macromolecules constitute promising candidates, particularly in the field of biomaterials [16,17,31,33]. These supramolecular nanoarchitectures can not only specifically control cell activation, but

Sandy Eap^{†1},
Alice Ferrand^{†1},
Jessica Schiavi^{†1},
Laetitia Keller^{†1},
Tunay Kokten^{†1,2},
Florence Fioretti^{†1,2},
Didier Mainard^{1,3},
Guy Ladam⁴ & Nadia Benkirane-Jessel^{*1,2,3}

¹INSERM, French National Institute of Health & Medical Research, Osteoarticular & Dental Regenerative Nanomedicine team, UMR1109, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg Cedex, France

²Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg, France

³Hôpital Central, Service de Chirurgie Orthopédique, 29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, F-54035 Nancy, France

⁴La2B (MERC EA3829) Université de Rouen, Centre Universitaire d'Evreux, 1 rue du 7ème Chasseurs, F-27002 Evreux Cedex, France

*Author for correspondence:

Tel.: +33 390 243 376

Fax: +33 390 243 379

nadia.jessel@inserm.fr

[†]Authors contributed equally

also mediate the local delivery of drugs, peptides, proteins or DNA, previously grafted, adsorbed or embedded into the multilayered films [19,21–27,30,33].

In orthopaedic surgery, Geistlich Bio-Gide™ collagen membranes are currently used for guided bone regeneration and guided tissue regeneration. The success of this membrane is based on the natural bilayer structure, which contributes to excellent soft-tissue integration and optimal bone regeneration [34–36]. The objective of this study was to implement the multilayered nanostructures approach to equip those already used in the clinic devices with nanocontainers of active compounds capable of improving the rate of bone regeneration: chitosan (CHI), a biocompatible polysaccharide with bone regenerative properties [37,38]; and BMP-2, a growth factor known to accelerate ECM production and bone tissue integration [39]. First, we inspected the build-up of our coating with quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D) and the structure and topography of our nanofibers by scanning electron microscopy (SEM). The potency of the BMP-2-loaded scaffolds with regards to bone regeneration was assessed both *in vitro* and *in vivo*.

Methods

■ Materials

CHI was purchased from Sigma (France) and Protasan up CL 113 was from FMC Biopolymer (Norway). DGL adendri-graft poly-L-lysine was purchased from Colcom (Montpellier, France). In this study, we used the fifth-generation DGL^{G5}. Human recombinant BMP-2 was purchased from PeproTech (France). Bio-Gide collagen membranes was purchased from Proforma (Geistlich Bio-Gide 30 × 40 mm).

■ Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring

QCM-D was operated with a D300 system (Q-Sense, Sweden) using a QAFC302 flow chamber and QSX301 gold-coated quartz crystal sensors. This technique consists of measuring the resonance frequency shifts (Δf) and the dissipation factor changes (ΔD) of the quartz crystal sensor upon material deposition. The LbL build-up was performed by successive injections of polyelectrolyte or protein solutions (500 μ l) and rinsing solution (500 μ l) through the flow chamber and was monitored *in situ*. Changes in the resonance frequencies were measured at the third overtone ($v = 3$) corresponding to the 15-MHz resonance frequency. A shift in

Δf can be associated, in the first approximation, to a variation of the mass adsorbed onto the crystal through the Sauerbrey relationship: $m = -C \times \Delta f \times v$. Where C is a constant characteristic of the crystal used ($C = 17.7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$). CHI (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and BMP-2 (200 ng ml^{-1}) were adsorbed by using 0.04 M MES (pH: 5.5) and 0.15 M NaCl solutions.

■ Build-up of the LbL films onto collagen membrane

For all biological activity experiments, (CHI/BMP-2)₆ nanoarchitectures were built-up onto Bio-Gide scaffolds by the LbL method by alternating immersions during the 15 min in the adequate solutions (300 μ l) at the respective concentrations of 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for CHI and DGL^{G5} solutions and 200 ng ml^{-1} for the BMP-2 solutions in presence of 0.04 M MES and 0.15 M NaCl at pH 5.5. After each deposition step, the membranes were rinsed for 15 min with 0.04 M MES and 0.15 M NaCl at pH 5.5. All membranes were sterilized for 30 min by exposure to UV light (254 nm; 30 W; distance 20 cm), and equilibrated in contact with 1 ml of serum-free medium prior to cell culture.

■ SEM observation

For morphological study, the scaffolds were gold-coated (Edwards Sputter Coater®, Edwards, Genevilliers, France) and observed with a Philips XL-30 ESEM® (Polymex, Fuveau, France) scanning electron microscope in conventional mode (high vacuum) with a Thornley-Everhart® (Polymex) secondary electron detector.

■ Cell culture

Human primary osteoblasts (HOB) were obtained from Cell Applications and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM®, Life Technologies, Saint Aubin, France) containing 50 U ml^{-1} penicillin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin, 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ amphotericin B and 10% FBS (Life Technologies, Paisley, UK). The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached subconfluence, they were harvested with trypsin and subcultured.

■ *In vitro* cell viability & proliferation

Cell viability was determined by trypan blue exclusion. AlamarBlue® (Serotec, France) was used to assess cellular proliferation. The AlamarBlue test is a nontoxic, water-soluble, colorimetric redox indicator that changes color in response to cell metabolism. In this study,

2×10^4 human osteoblasts were seeded on top of LbL-coated 14-mm-diameter scaffolds ($n = 3$) placed on 24-well plates. After 2 days of culture, cells were incubated in 10% AlamarBlue/DMEM solution in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. After 4 h, 100 µl of incubation media was transferred to 96 well plates and measured at 590 nm and 630 nm in order to determine the percentage of AlamarBlue reduction.

■ *In vitro* analysis of the mineralization using a fluorescent dye

Xylenol orange powder (Sigma) was dissolved in distilled water to make the 20 mM stock solution. Xylenol orange was added to medium overnight to a final concentration of 20 µM. Before the microscopic examination, the samples were rinsed with fresh medium without fluorochrome to avoid nonspecific fluorescence. Xylenol orange expresses a red color under the fluorescent microscope (LEICA DM4000 B).

■ Immunofluorescence

Collagen scaffolds with and without BMP-2 were seeded with 2×10^4 HOB cells. After 21 days of culture in proliferation medium, cells were fixed with 4% PFA for 1 h, rinsed three times with PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 h, then rinsed three times with PBS. Indirect immunostaining was performed after the fixation. The primary antibody used was the rabbit polyclonal antiosteopontin (1/600, Abcam, Paris, France) incubated for 20 min for bone detection. The secondary antibody was goat antirabbit conjugated to Alexa Fluor 488 (1/250, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, USA) incubated overnight. After three rinses with PBS, cells were mounted on microscope slides using Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK) and imaged by a microscope equipped for fluorescence (LEICA DM4000B).

■ *In vitro* analysis of the mineralization using Alizarin Red S staining

The samples were fixed with a solution of PFA 4% in PBS overnight at 4°C. They were then dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, cleared with toluene and embedded in paraffin wax. Sections were cut at 7 µm using a sledge microtome and mounted on glass slides. After the removal of paraffin wax, sections of the different samples were stained using Alizarin Red S (Sigma Aldrich). Alizarin Red S powder was dissolved in distilled water in a

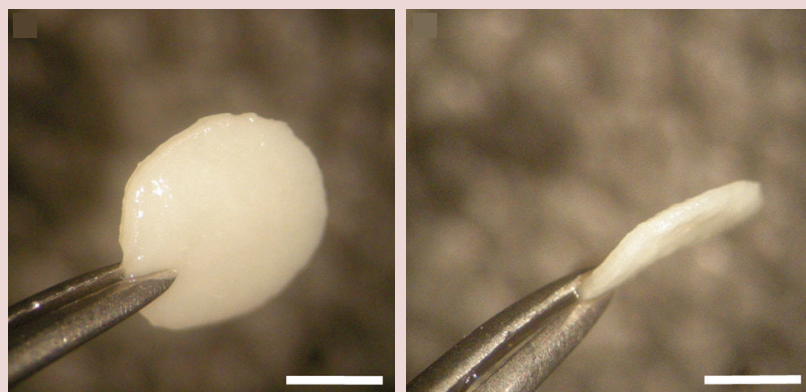


Figure 1. Macroscopic views of the Geistlich Bio-Gide™ collagen membranes currently used in the clinic for bone regeneration. Scale bars: 2.5 mm.

concentration of 2 g per 100 ml. The samples were incubated in the Alizarin Red solution for 20 min and then rinsed with distilled water several times. The sections were then observed under the optical microscope (LEICA DM4000 B).

■ *In vivo* implantations

In this study, nude mice were implanted on the skull. The mice were anesthetized with isoflurane gas and animals were placed on ventral decubitus on a heating table, with strict aseptic conditions after skin incision, two bony defects (5-mm size of bony defect) were performed using an electric drill with a sterile round bur under irrigation of sterile normal saline before deposition of two samples and sutures with Ethicon 9/0. The skin was closed with sutures and the animal's behavior was observed after waking up. The mice were sacrificed with an intraperitoneal injection of a lethal dose of ketamine and the samples are extracted after 42 days of implantation. For all *in vivo* studies, male MF1-nu/nu

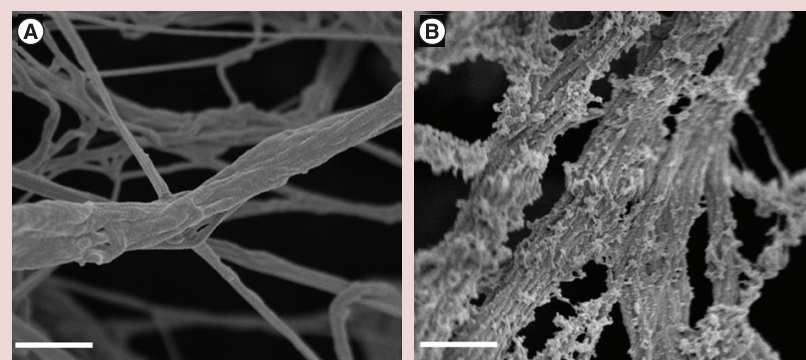


Figure 2. Scanning electron microscopy visualization of the Bio-Gide™ collagen nanofibers. (A) Before treatment (native, not functionalized), and (B) after deposition of a (chitosan/BMP-2)₆ architecture (functionalized). Scale bars: 1 µm.

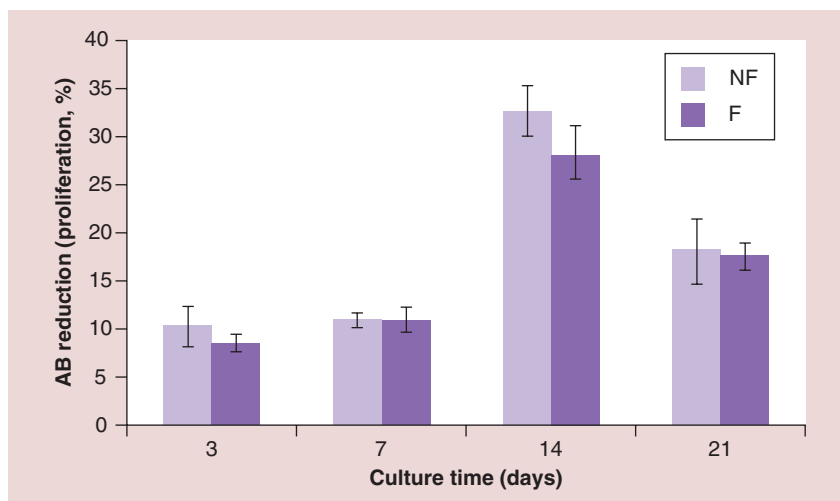


Figure 3. *In vitro* proliferation of human osteoblasts growing onto the native collagen nanofibers and onto the collagen nanofibers functionalized by (chitosan/BMP-2)₆ nanoreservoirs (functionalized) after 3, 7, 14 and 21 days.

F: Functionalized by chitosan/BMP-2; NF: Not functionalized (native).

mice (5 weeks old, weight 30 g) were purchased from Harlan (IL, USA) and acclimatized for a minimum of 1 week prior to experimentation. All procedures were performed with prior received ethical approval and carried out in accordance with the regulations laid down for animals.

■ Histological examination of bone regeneration using Mallory coloration

The implants were fixed with BouinHollande solution for 2 days. Then, they were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, cleared with toluene and embedded in paraffin wax. Sections were cut at 7 μm using a sledge microtome and mounted on glass slides. After the removal of paraffin wax, the sections were stained using Mallory coloration for 2 days.

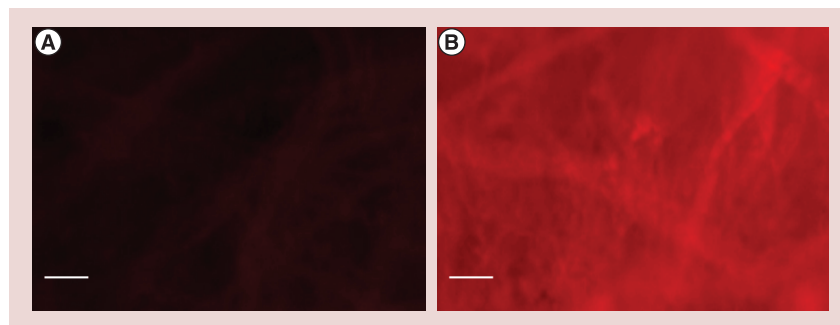


Figure 4. Calcium deposit analysis. Xylenol orange detection (in red) of calcium deposit on the collagen nanofibers after 21-day incubation of human osteoblasts (A) before and (B) after functionalization with (chitosan/BMP-2)₆ nanocontainers. Intensity average quantification: (A) 22.5 ± 2.3 and (B) 51.2 ± 4.1 . We have an increase of 23% of bone mineralization by using the functionalized implant in the presence of chitosan/BMP-2 compared with the native implant. Scale bars: 50 μm .

■ Confocal Raman microspectroscopy

After 42-day implantation into mouse calvaria, the implants were explanted, rinsed with PBS, fixed with PFA 4% for 24 h at 4°C, then rinsed three times and stored in PBS. Prior to Raman analysis, the implants were briefly rinsed with water and dried under a gentle flow of argon. Raman measurements were carried out in air using a confocal Raman microspectrometer composed of a Raman spectrometer (LabRam HR® [Horiba Scientific, Neuhausen, Germany] by Jobin-Yvon Horiba with a 600 line mm^{-1} grating) coupled to a microscope (Model BX41, Olympus, France) with xyz mapping stage via optical fibers. The excitation of Raman scattering was operated with a helium-neon laser at a wavelength of 632.8 nm. The laser beam was focused on the sample by means of a $\times 50\text{LWD}$ microscope objective. Confocal pinholes of 400 μm diameter for single spectra and 250- μm diameter for 2D mappings placed before the entrance slit were used to reject Raman signal from out-of-focus planes. Raman spectra with a good signal-to-noise ratio were recorded with an integration time of 60 s for single spectra and 20 s for 2D mappings.

Results & discussion

Recently, we have reported on the effective incorporation of BMP-2 into (DGL^{G5}/BMP-2)₆ LbL architectures with DGL, a dendrigraft of poly-L-lysine [39]. The mean amount of hydrated BMP-2 growth factor immobilized was approximately $1.53 \mu\text{g cm}^{-2}$. Here, we have used US FDA-approved CHI as polycationic polysaccharide to incorporate the BMP-2 into the nanostructured coatings. CHI is derived from chitin, a polysaccharide found in the exoskeleton of shellfish such as shrimps, lobsters and/or crabs. The effective build-up of (CHI/BMP-2)_n LbL architectures onto gold-coated substrates was demonstrated by QCM-D up to six adsorption cycles. It followed a linear growth regimen with deposited mass increments of approximately $1.1 \mu\text{g cm}^{-2}$ corresponding to 10 nm in equivalent uniform thickness upon each new deposited CHI/BMP-2 layer pair. The mean amount of hydrated BMP-2 growth factor immobilized was approximately $0.73 \mu\text{g cm}^{-2}$, which is twofold lower than with DGL^{G5}. This must be due to more efficient interactions of the protein with the dendritic structure of DGL^{G5} than with the linear structure of CHI. Our ultimate goal is to propose this new implant as a unique active medical device, we have chosen the FDA-approved CHI and not DGL. After SEM analysis of the

nanofiber collagen implant before and after the coating, we have preferred to functionalize the implants by (CHI-BMP-2)₆ and not (CHI-BMP-2)₃, showing more homogeneity of the coating.

The aim of this work is to functionalize active collagen membrane by active nanocontainers that are able to increase the speed of bone regeneration. The effective deposition, and nanoscale dimensions, of the bioactive coating onto Bio-Gide collagen membranes (FIGURE 1) were confirmed by means of SEM. While the native nanofibers displayed a smooth topography (FIGURE 2A), (CHI/BMP-2)₆-treated nanofibers were coated with uniformly distributed ‘fish scale’-like nanostructured deposits (FIGURE 2B). Interestingly, this open fish scale-like morphology was very different from the compact spheroid morphology of (DGL^{GS}/BMP-2)₆ deposits obtained both on collagen membranes and on poly-ε-caprolactone (PCL) membranes [39]. Distinct morphologies can be explained by the low flexibility/high persistence length (6–12 nm) of CHI chains [40], limiting the interactions with BMP-2, while the high flexibility/low persistence length (2 nm) of poly-L-lysine chains of DGL allows optimized interactions with BMP-2 [41].

In order to explore the capacity of the modified collagen membranes to induce bone formation *in vitro*, we have first compared the adhesion of human osteoblasts onto native or (CHI/BMP-2)₆-treated collagen implants. In line with recently published data [42,43], morphology changes between cells adhering onto native and LbL-treated collagen scaffolds were likely to be due to the combined modifications of both the surface chemistry and the nanotopography upon the LbL treatment (data not shown).

We then followed the proliferation and cell activity of human osteoblasts for 21 days onto (CHI/BMP-2)₆-treated collagen implants compared with native implants (FIGURE 3). Our results showed similar cell behavior for both the functionalized and not collagen membranes (FIGURE 3), reaching a peak value at day 14. Cell activity then significantly decreased between day 14 and day 21 for both types of substrate. This fall down in proliferation and cell activity, at this stage, is certainly due to the osteoblasts undergoing differentiation to produce their own biomineralized ECM. We have also shown that after 21 days of culture, the proliferation decreased dramatically due to the mineralization at this stage (FIGURE 4). Therefore, at 42 days we are unable to follow the proliferation. These results

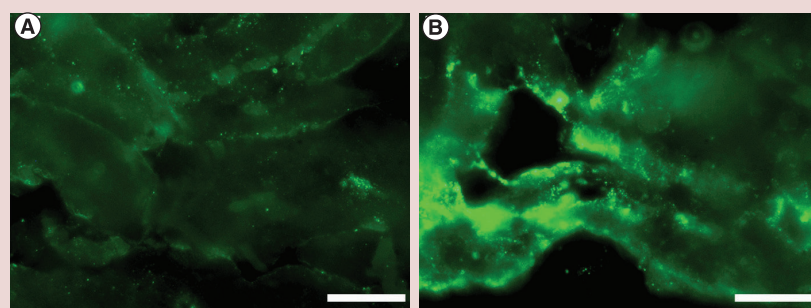


Figure 5. Osteopontin expression (in green) in primary osteoblasts cells cultured for 21 days on (A) nonfunctionalized collagen membrane and (B) functionalized (chitosan/BMP-2)₆-treated collagen membrane. No osteopontin induction was detected by using (chitosan/BSA)₆-treated collagen membrane as a negative control. Scale bars: 20 μm.

show that the functionalization of the collagen implants with (CHI/BMP-2)₆ nanocontainers did not impair the cell activity.

In order to assess the improvement of *in vitro* bone formation induced by primary osteoblasts in contact with the BMP-2 nanocontainers, we compared the extent of calcium depositions onto the native collagen implant and (CHI/BMP-2)₆-treated membranes in the presence of primary osteoblasts. In this study, Xylenol orange fluorescence used as staining for the specific calcium depositions clearly indicated more mineralization onto (CHI/BMP-2)₆-treated collagen scaffolds than onto the native scaffold (FIGURE 4). After an intensity average quantification (22.5 ± 2.3 [FIGURE 4A] and 51.2 ± 4.1 [FIGURE 4B]), we have shown an increase of 23% of bone mineralization by using the functionalized implant (CHI/BMP-2) compared with the native implant. We have also analyzed by immunochemistry the capacity of these nanoreservoirs, in the presence of human osteoblasts, to induce *in vitro*-specific

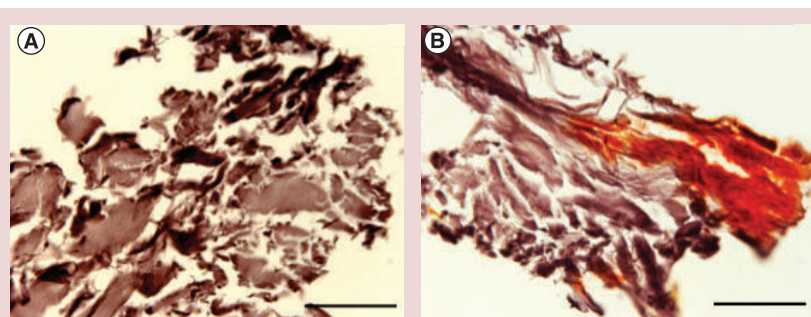


Figure 6. Alizarin Red detection of bone mineralization. Alizarin Red detection of calcium depositions on the collagen nanofibers after 21-days incubation of human osteoblasts (A) before and (B) after functionalization with (chitosan/BMP-2)₆ nanocontainers. No calcium deposition was detected after 21 days of culture on the native collagen membrane without BMP-2. Scale bars: 100 μm.

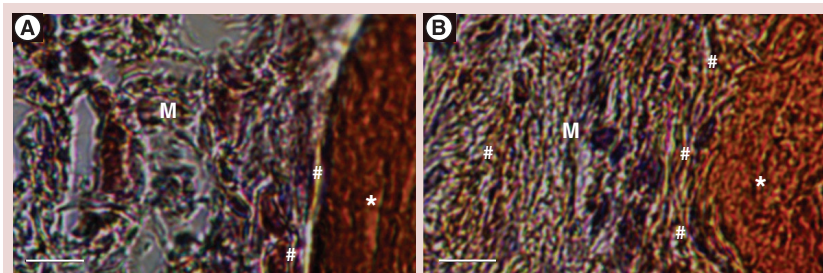


Figure 7. Histological analysis of bone induction. Histological analysis and the detection of bone induction after 42 days *in vivo* implantation on skull of nude mice of the (A) native collagen implant and the (B) functionalized collagen implant by the active nanoreservoirs of (chitosan/BMP-2)₆. Blue areas show cell colonization. Scale bars: 25 μm. *: Host bone (orange/red); #: New mineralized matrix (yellow); M: Collagen membrane nanofibers.

osteopontin expression after 21 days of culture (FIGURE 5). This result strongly suggests that the entrapment of BMP-2 into fish scale-like CHI-based LbL nanocontainers preserved its accessibility to osteoblast cells, as well as its ability to increase and accelerate the mineralization of the ECM produced by the osteoblasts. For more *in vitro* analysis, we have also followed by Alizarin Red detection the calcium deposition on the collagen nanofibers after 21 days incubation of human osteoblasts before and after functionalization with (CHI/BMP-2)₆ nanoreservoirs, and shown calcium deposition when functionalized by BMP-2 (orange detection) and no deposition on the native collagen implant (FIGURE 6).

After the *in vitro* bone induction, we also analyzed the potential of our active implants to induce bone regeneration *in vivo*. A native collagen implant and a (CHI/BMP-2)₆-treated implant were implanted into mouse calvaria defects for 42 days. The histological study was then carried out to observe the scaffold colonization by the host cells in the bone defect site, the osseointegration and the new bone mineralization. Mallory coloration was used in order to distinguish between mineralized bone, ECM and nuclear cell (FIGURE 7). The results clearly indicate excellent osseointegration of both (CHI/BMP-2)₆-treated and untreated collagen membranes, with slightly better results for the treated implant (FIGURE 7B). Colonization and migration of osteoblasts from the site of implantation within both implants clearly occurred, as shown by the fibrous aspect of the samples filled with native osteoblasts. However, the (CHI/BMP-2)₆-treated collagen implant appears to be more cohesive and shows the formation of an ECM undergoing mineralization (FIGURE 7B).

The bone mineralization of a native collagen implant, and a (CHI/BMP-2)₆-treated

collagen implant after 42-day implantation in calvaria was also inspected by confocal Raman microspectroscopy, to detect calcium phosphate (CaP) deposition (FIGURE 8). In this study, we have also analyzed, as a control, a treated implant by using a dendrigraft of L-lysine (DGL^{G5}) instead of CHI. These implants were also implanted and analyzed in order to test the versatility of the LbL method for embedding BMP-2 onto the collagen proposed new device. The Raman signatures were very similar for all the implanted scaffolds, except for the bands at 430–450 cm⁻¹ (ν₂ PO₄³⁻), 580–610 cm⁻¹ (ν₄ PO₄³⁻), 962 cm⁻¹ (ν₁ PO₄³⁻) and 1072 cm⁻¹ (ν₁ CO₃²⁻ and ν₃ PO₄³⁻), which, promisingly, are relative to B-type carbonated hydroxyapatite (PO₄³⁻ substituted by CO₃²⁻), the major mineral component of bone (FIGURE 8) [44,45]. 2D mappings of the 962-cm⁻¹ Raman peak intensity of B-type carbonated hydroxyapatite revealed extensive *in vivo* mineralization over both (CHI/BMP-2)₆- and (DGL^{G5}/BMP-2)₆-treated scaffolds, while no trace of mineralization was found atop the untreated implant after 42 days implantation (FIGURE 8). These results support the promising effect of BMP-2-based nanocontainer deposits on the biomineralization of the implants. In line with our previous work with PCL nanofibrous implants [39], DGL^{G5}-based nanoreservoirs of BMP-2 was confirmed here to be a versatile and efficient strategy to induce bone formation. CHI-based nanoreservoirs of BMP-2 show similar results in terms of biomineralization *in vivo*, and seem, to us, to be more promising in the short-/mid-term because CHI is an FDA-approved component, while DGL^{G5} is not yet. In addition, although DGL^{G5} was shown to allow higher loading of the nanoreservoirs with BMP-2 than CHI, as seen before, the amount of growth factor immobilized by means of CHI is sufficient to reach the same extent of implant biomineralization. This can be due to the open fish scale-like morphology of CHI-based nanoreservoirs allowing easier degradation, and thus offering better accessibility to BMP-2 to the cells than the compact spheroid morphology of DGL^{G5}-based nanoreservoirs [39].

Conclusion

At this stage, our results show that we can functionalize a collagen implant already used in the clinic with nanocontainers of BMP-2 made by CHI (FDA approved), induce bone formation *in vitro* and *in vivo*, and accelerate the speed of bone regeneration *in vivo*.

The European and American authorities have already approved the use of BMP-2 for bone regeneration applications. For example, Medtronic offers InductOS™ (Medtronic, Boulogne-Billancourt, France), which is a basic collagen matrix soaked in BMP-2. The efficacy of this kind of combination device is dependent on slow release kinetics for BMPs, which is recognized as the critical, most challenging requirement for combination implants. For efficient bone regeneration, the target cells require a reliable and continuous exposure to growth factors over an extended period of time, until the induction of new bone. However, degradation of BMP-2 occurs rapidly in aqueous solution. With current systems using collagen matrices soaked with the growth factor, this problem is addressed by overdosing, which may induce adverse side effects. The novelty of our approach lies in the nanoimmobilization of BMP-2. The nanostructured scaffold is produced by the LbL technology, which allows to be entrapped the growth factor into nanocontainers atop the scaffold fibers. Recently, we have elucidated the mechanism by which cells come in to contact and interact with such nanostructured coating [19,43]. Encapsulated by polymers, BMP-2 is likely to be protected and stabilized. Once cells come into contact with the deposits, cellular enzymes degrade this polymer coating and BMP-2 becomes available. As cells grow, divide and infiltrate deeper into the porous structure of the membrane, they provoke a slow and progressive release of BMP-2 that, in turn, further stimulates the biomineralization of the ECM. This strategy aims to considerably enhance therapeutic efficacy and should lead to implants that are capable, at a reduced cost, of more robust and durable bone repair in large defects compared with current less sophisticated approaches.

Future perspective

Over the next decades, new therapeutics based on nanotechnology could offer significant opportunities to revolutionize medicine. On the other hand, if nanomedicine wants to realize its full potential, some major legal and economic obstacles have to be removed. Here, we describe active living collagen implants with highly promising bone regenerative properties. Our nanotechnology approach allows protective encapsulation as a nanoreservoir of growth factor. This strategy may be used as a new design reflection for a future generation of smart implants for regenerative nanomedicine application.

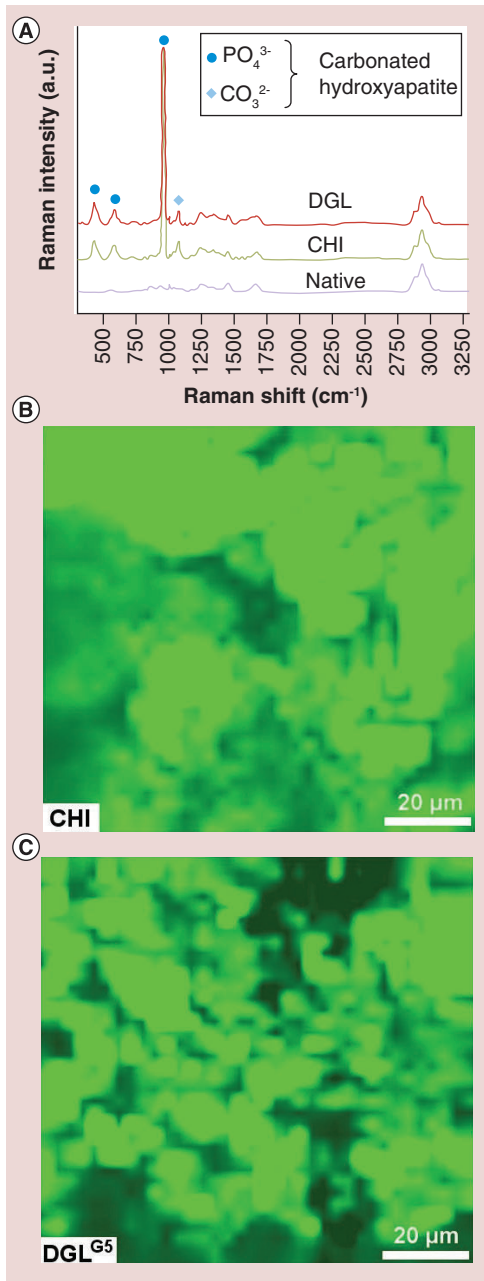


Figure 8. Raman analysis of native (chitosan/BMP-2)₆-treated and (DGL^{G5}/BMP-2)₆-treated collagen implants after 42-day implantation in mouse calvaria. (A) Typical Raman spectra showing the biomineralization of calcium phosphate within the form of carbonated hydroxyapatite over both BMP-2-enriched implants, and not over the native implant. Spectra were offset for the sake of clarity. **(B & C)** 2D mapping of the 962 cm⁻¹ Raman peak of carbonated hydroxyapatite over the BMP-2-enriched implant (100 × 100 μm²; mesh size 2.8 μm).

Acknowledgements

The authors thank MF Rubner from the Department of Materials Science and Engineering, Massachusetts Institute of Technology (MA, USA) for helpful scientific discussions.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by the project Nano OSCAR from the 'Agence Nationale de la Recherche, ANR'. N Benkirane-Jessel is indebted to CHU de Nancy, Hôpital Central, 'Chirurgie Orthopédique et Traumatologie' (Contrat d'interface INSERM vers l'hôpital). G Ladame thanks the 'Grand Évreux Agglomération' and the 'Conseil Général

de l'Eure' for partial financial support of La2B. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

- We report on active collagen implants equipped by nanocontainers of BMP-2 for regenerative nanomedicine.
- The sophisticated strategy described here should enhance the efficacy of therapeutic implants compared with current simplistic approaches soaked with BMP-2.
- Our nanotechnology approach allows protective encapsulation as a nanoreservoir of growth factor.
- We believe that we can develop safer and more effective new-based nanomedicines in a cost-effective and efficient manner.
- This strategy may serve as a design reflection for biologically inspired materials technologies.

References

- Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58(14), 1456–1459 (2006).
- Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int. J. Cancer* 120(12), 2527–2537 (2007).
- Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18(1), 26–30 (2007).
- Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.* 24(10), 1211–1217 (2006).
- Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science* 263(5154), 1715–1720 (1994).
- Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (NY)* 13(6), 565–576 (1995).
- Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 428(6982), 487–492 (2004).
- Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science* 295(5557), 1009–1014 (2002).
- Chaikof EL, Matthew H, Kohn J, Mikos AG, Prestwich GD, Yip CM. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Ann. NY Acad. Sci.* 961, 96–105 (2002).
- Yang C, Hillas PJ, Baez JA *et al.* The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* 18(2), 103–119 (2004).
- Kumar G, Tison CK, Chatterjee K *et al.* The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials* 32(35), 9188–9196 (2011).
- Pullela SR, Andres C, Chen W, Xu C, Wang L, Kotov NA. Permeability replication of artificial glomerular basement membranes in nanoporous collagen multilayers. *J. Phys. Chem. Lett.* 2(16), 2067–2072 (2011).
- Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14(1), 61–86 (2008).
- Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.* 6(1), 13–22 (2010).
- Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat. Biotechnol.* 20(11), 1111–1117 (2002).
- Choi JH, Park YW, Park TH *et al.* Fuzzy nanoassembly of polyelectrolyte and layered clay multicomposite toward a reliable gas barrier. *Langmuir* 28(17), 6826–6831 (2012).
- Wang D, Rogach AL, Caruso F. Semiconductor quantum dot-labeled microsphere bioconjugates prepared by stepwise self-assembly. *Nano. Lett.* 2(8), 857–861 (2002).
- Berth G, Voigt A, Dautzenberg H, Donath E, Mohwald H. Polyelectrolyte complexes and layer-by-layer capsules from chitosan/chitosan sulfate. *Biomacromolecules* 3(3), 579–590 (2002).
- Jessel N, Atalar F, Lavalle P *et al.* Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv. Mater.* 15(9), 692–695 (2003).
- Hiller J, Mendelsohn JD, Rubner MF. Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. *Nat. Mater.* 1(1), 59–63 (2002).
- Benkirane-Jessel N, Schwinte P, Falvey P *et al.* Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam–cyclodextrin complexes. *Adv. Funct. Mater.* 14(2), 174–182 (2004).
- Jessel NB, Schwinte P, Donohue R *et al.* Pyridylamino-beta-cyclodextrin as a molecular chaperone for lipopolysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Adv. Funct. Mater.* 14(10), 963–969 (2004).
- Benkirane-Jessel N, Lavalle P, Hubsch E *et al.* Short-time tuning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers. *Adv. Funct. Mater.* 15(4), 648–654 (2005).
- Gangloff SC, Ladame G, Dupray V *et al.* Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Biomaterials* 27(9), 1771–1777 (2006).
- Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F *et al.* Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103(23), 8618–8621 (2006).
- Dierich A, Le Guen E, Messaddeq N *et al.* Bone formation mediated by synergy-acting growth factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film. *Advanced Materials* 19(5), 693–697 (2007).
- Zhang X, Sharma KK, Boeglin M *et al.* Transfection ability and intracellular DNA pathway of nanostructured gene-delivery systems. *Nano Lett.* 8(8), 2432–2436 (2008).
- Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C *et al.* Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(8), 3406–3411 (2010).
- Lee J, Kotov NA. Notch ligand presenting acellular 3D microenvironments for *ex vivo* human hematopoietic stem-cell culture made by layer-by-layer assembly. *Small* 5(9), 1008–1013 (2009).

- 30 Shim BS, Podsiadlo P, Lilly DG *et al.* Nanostructured thin films made by dewetting method of layer-by-layer assembly. *Nano Lett.* 7(11), 3266–3273 (2007).
- 31 Macdonald M, Rodriguez NM, Smith R, Hammond PT. Release of a model protein from biodegradable self assembled films for surface delivery applications. *J. Control Release* 131(3), 228–234 (2008).
- 32 MacDonald MI, Samuel RE, Shah NJ, Padera RF, Beben YM, Hammond PT. Tissue integration of growth factor-eluting layer-by-layer polyelectrolyte multilayer coated implants. *Biomaterials* 32(5), 1446–1453 (2011).
- 33 Shah NJ, Macdonald ML, Beben YM, Padera RF, Samuel RE, Hammond PT. Tunable dual growth factor delivery from polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 32(26), 6183–6193 (2011).
- 34 Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin. Oral Implants Res.* 15(4), 443–449 (2004).
- 35 Zitzmann NU, Naef R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 12(6), 844–852 (1997).
- 36 Schwarz F, Rothamel D, Herten M *et al.* Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin. Oral Implants Res.* 19(4), 402–415 (2008).
- 37 Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26(30), 5983–5990 (2005).
- 38 Kim IY, Seo SJ, Moon HS *et al.* Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* 26(1), 1–21 (2008).
- 39 Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S *et al.* Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1), 483–490 (2012).
- 40 Cölfen H, Berth G, Dautzenberg H. Hydrodynamic studies on chitosans in aqueous solution. *Carbohydr. Polym.* 45(4), 373–383 (2001).
- 41 Brant DA, Flory PJ. The configuration of random polypeptide chains. I. Experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* 87(13), 2788–2791 (1965).
- 42 Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazzone M, Liley M, Ploux L. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater.* 6(10), 3824–3846 (2010).
- 43 Wheeldon I, Farhadi A, Bick AG, Jabbari E, Khademhosseini A. Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell-materials interactions. *Nanotechnology* 22(21), 212001 (2011).
- 44 Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif. Tissue Int.* 63(6), 475–481 (1998).
- 45 Crane NJ, Popescu V, Morris MD, Steenhuis P, Ignelzi MA. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone* 39(3), 434–442 (2006).

Chapitre 2

Propriétés ostéogéniques d'une membrane fine nanofibreuse de PCL fonctionnalisée par des nanoréservoirs actifs

- Eap S, Ferrand A, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, Atmani H, Mély Y, Fioretti F, Schlatter G, Kuhn L, Ladam G & Benkirane-Jessel N (2014). Osteogenetic Properties of Electrospun Nanofibrous PCL Scaffolds Equipped with Chitosan-based Nanoreservoirs of Growth Factors. *Macromolecular Bioscience* 14(1):45-55.

2.1. Contexte et objectifs

Les cliniciens utilisent aujourd'hui des membranes (implants) à base de collagène provenant d'animaux ou de cadavres humains. Malgré les avantages certains de ces membranes, les risques liés à leur utilisation persistent. Afin de pallier ces risques, les recherches se sont concentrées sur le développement de membranes synthétiques pour la médecine régénérative osseuse. Différentes techniques ont été développées afin de produire des supports toujours plus proches de la structure de la matrice extracellulaire. Des membranes biomimétiques inspirées de la structure nanofibrillaire de la matrice extracellulaire osseuse ont montré des résultats prometteurs dans différents domaines de l'ingénierie tissulaire (Langer and Tirrell, 2004 ; Dvir et al., 2011). Cependant, il est reconnu que les biomatériaux inertes même biomimétiques ne suffisent pas à une régénération osseuse rapide et durable. Idéalement, le biomatériau serait combiné à l'utilisation de molécules actives telles que des facteurs de croissance ou de différenciation permettant d'accélérer la synthèse de matrice extracellulaire et l'intégration tissulaire (Porter et al., 2009). À cette fin, des résultats significatifs sont attendus grâce aux progrès accomplis dans le développement de la conception de membranes biomimétiques et leur fonctionnalisation avec des composés bioactifs (Kenawy et al., 2003; Jessel et al., 2006; Daubine et al., 2009; Yoo et al., 2009 ; Mendoza-Palomares et al., 2012).

Nous avons travaillé au développement d'une membrane synthétique biomimétique et bioactive que nous appellerons « membrane fine ». Grâce à la technique de l'électrospinning qui permet de produire des nanofibres de diamètre pouvant atteindre quelques dizaines de nanomètres, il est possible de développer des membranes synthétiques nanofibreuses mimant la structure nanofibrillaire de la MEC (Boudriot et al., 2006; Cipitria et al., 2011). De plus, afin de rendre ces membranes fines bioactives, nous avons développé une technologie reposant sur la technique des multicouches de polyelectrolytes (Mendoza-Palomares et al., 2012). Nous avons ainsi combiné des membranes nanofibreuses biomimétiques de poly(ϵ -caprolactone) (PCL, approuvé par la FDA) à la technologie des nanoréservoirs actifs afin d'améliorer leurs propriétés ostéoinductrices. La fonctionnalisation des membranes fines a été réalisée par incorporation de BMP-2 (aussi approuvée par la FDA) dans des nanoréservoirs. L'objectif était de former ces nanoréservoirs à partir de macromolécules de natures différentes afin de comparer non seulement le mode d'immobilisation du principe actif, mais aussi leur

effet en terme de régénération osseuse. Pour cela, la vérification de la construction des réservoirs de BMP-2 s'est faite à partir de deux polycations différents: la poly(L-lysine) (PLL) qui est un polypeptide linéaire, et le chitosane (CHI) qui est un polysaccharide linéaire.

2.2. Résultats et discussions

2.2.1. Influence de la nature des polyélectrolytes sur les nanoréservoirs

Nous avons développé la technologie des nanoréservoirs actifs à partir de la technique de fonctionnalisation des films de multicouches de polyélectrolytes. Nous avons confirmé la construction de 3 bicouches (CHI/BMP-2) et (PLL/BMP-2) par QCM-D. Bien que la croissance des bicouches (CHI/BMP-2) suive un régime linéaire, celle des bicouches (PLL/BMP-2) suit un régime exponentiel. Ceci est directement lié à la structure des chaînes de polyélectrolytes les rendant plus ou moins rigides ou flexibles. Cependant, malgré cette différence, les deux systèmes conduisent à des quantités de BMP-2 incorporées équivalentes : $0,83 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ pour les nanoréservoirs à base de PLL, et $0,73 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ pour les nanoréservoirs à base de CHI. La morphologie des nanoréservoirs a été observée au MEB. En comparaison à la morphologie écaillée des nanoréservoirs à base de chitosane, les nanoréservoirs à base de PLL présentent une morphologie plus sphérique et lisse. L'incorporation effective de la molécule active au sein des nanoréservoirs sur les nanofibres de PCL a été démontrée grâce à l'utilisation de la BSA^{AF488} fluorescente observée en microscopie *d*STORM.

En utilisant des polycations de nature et de structure différentes (polypeptidiques ou polysaccharidiques, branchée ou linéaire) pour la construction de ces nanoréservoirs, nous avons étudié le mode d'immobilisation et l'effet du polyélectrolyte « conteneur » sur ces nanoréservoirs. En complément d'un dendrigraft de lysine de génération 5 (DGL-G5) qui avait déjà été testé auparavant (Mendoza-Palomares et al., 2012), nous avons étudié la poly(L-lysine) (PLL), et le chitosane (CHI).

Nous avons ainsi mis en évidence que les nanoréservoirs présentent une morphologie principalement liée à la nature du polyélectrolyte « conteneur » qui était le polycation dans nos études, le polyanion étant toujours le facteur de croissance.

La nature du polycation (polysaccharidique ou polypeptidique) ainsi que sa structure (linéaire ou dendritique) détermine la morphologie des nanoréservoirs. En effet, selon la flexibilité plus ou moins grande des chaînes du polyélectrolyte, le contact avec la molécule active est différent et forme alors une structure de nanoréservoir plus ou moins ouverte. Les études sur différents types de polycations ont montré qu'une grande flexibilité liée à une faible longueur de persistance des chaînes polycationiques (DGL-G5, PLL) conduit à une interaction optimisée entre polycations et facteur de croissance. Les nanoréservoirs à base de polypeptides, qu'ils soient dendritiques ou linéaires (DGL-G5 ou PLL), présentent une morphologie plutôt lisse et sphérique (**Chapitre 2**) (Mendoza-Palomares et al., 2012). En revanche, une faible flexibilité liée à une longueur de persistance importante des chaînes polysaccharidiques (CHI) entraîne des interactions limitées entre polycations et facteur de croissance. Les nanoréservoirs de chitosane présentent donc une morphologie « écailleuse » et beaucoup plus rugueuse (**Chapitre 1**).

De plus, la quantité de facteur de croissance incorporée est également directement liée à la structure du polycation utilisé. En effet, le polycation dendritique DGL-G5 permet l'incorporation d'une quantité de BMP-2 deux fois supérieure à celle incorporée au sein des nanoréservoirs de PLL ou de CHI (Mendoza-Palomares et al., 2012). Ceci est possible grâce à la structure dendritique du DGL-G5. Cette structure largement ouverte engendre de multiples interactions avec la BMP-2 au contraire des polycations linéaires dont le nombre d'interactions avec la BMP-2 est plus limité. Il est ainsi possible non seulement de faire varier la quantité de BMP-2 incorporée au sein des nanoréservoirs mais aussi de modifier la topographie des implants à l'échelle des fibres.

2.2.2. Propriétés ostéogéniques des nanoréservoirs

Les tests *in vitro* effectués (suivi de la prolifération cellulaire, observation de l'expression de l'ostéopontine par immuno-marquage, marquage fluorescent de la minéralisation par le Xylénol orange et analyse au Raman confocal) montrent que les nanoréservoirs à base de chitosane sont plus efficaces et possèdent un effet ostéoinducteur plus prononcé que les nanoréservoirs à base de poly-(L-lysine).

Ces résultats ont été confirmés par implantations des membranes fines fonctionnalisées de nanoréservoirs (CHI/BMP-2)₃ ou (PLL/BMP-2)₃ en calvaria chez la souris durant 4 semaines. Les analyses *in vivo* au Raman confocal ont confirmé la plus grande efficacité des nanoréservoirs actifs de chitosane. En effet, ceux-ci montrent une biominéralisation après un mois d'implantation contrairement aux membranes fonctionnalisées à base de PLL. L'observation de coupes histologiques montre une excellente ostéointégration, une bonne colonisation cellulaire ainsi qu'une meilleure synthèse matricielle au sein de la membrane fonctionnalisée avec des nanoréservoirs de chitosane.

Ces résultats démontrent la capacité des nanoréservoirs à protéger la molécule active incorporée sans perte d'activité biologique. En effet, même après un mois d'implantation *in vivo*, l'action des nanoréservoirs actifs est visible et se traduit par une accélération significative de la vitesse de régénération osseuse au niveau des implants fonctionnalisés. Il n'y a pas de libération passive de la molécule active mais au contraire une dégradation active des nanoréservoirs par les cellules elles-mêmes permettant une libération contrôlée de la molécule incorporée. Ainsi, l'accès des facteurs de croissance dépend entièrement des cellules et du stade auquel celles-ci se trouvent dans le processus de régénération osseuse. L'accessibilité plus ou moins facile des cellules aux nanoréservoirs est cruciale, et dépend également de la flexibilité du polyélectrolyte « conteneur » discutée précédemment. Cependant, le mécanisme et la vitesse à laquelle les cellules dégradent les nanoréservoirs sont encore méconnus. Ils pourraient faire l'objet de recherches poussées afin de mieux comprendre ces phénomènes et d'optimiser la vitesse d'accès d'une molécule active en faveur d'une autre (couplage de facteur de croissance et d'anti-cancéreux par exemple).

Toutefois, la nature du polyélectrolyte « conteneur » reste le paramètre le plus important car il peut influencer sur la régénération osseuse. Le chitosane, malgré une incorporation moins importante de facteur de croissance que celle due au DGL-G5, est reconnu pour ses propriétés ostéoconductrices (Raftery et al., 2013 ; Ding et al., 2014), et parce qu'il est approuvé par la FDA, il est ainsi le choix le meilleur et le plus logique pour une application dans l'ingénierie osseuse. Les résultats de l'étude précédente sur la fonctionnalisation des membranes de collagène ont d'ailleurs montré l'efficacité des nanoréservoirs à base de chitosane et de BMP-2. Cette étude confirme ces résultats et démontre clairement que les nanoréservoirs actifs à base de chitosane ont un effet accélérant la régénération osseuse *in vitro* en présence d'ostéoblastes humains mais également *in vivo* lorsque les membranes sont implantées en calvaria chez le modèle murin.

2.3. Conclusion

Nos résultats montrent clairement que la fonctionnalisation de nos membranes synthétiques nanofibreuses avec des nanoréservoirs actifs de BMP-2 améliore leurs propriétés ostéogéniques tout en favorisant l'accélération de la régénération osseuse. Nous avons aussi démontré que les nanoréservoirs à base de chitosane sont plus efficaces en terme de régénération osseuse en présence de BMP-2. Ces nanoréservoirs ont aussi la particularité d'utiliser des quantités très réduites de facteurs de croissance.

Actuellement le chirurgien imbibe la membrane de collagène avec une grande dose de BMPs (12 mg.mL^{-1}) pouvant induire des effets indésirables, voir même provoquer des effets contraires à ce qui était attendu. Grâce à notre technologie des nanoréservoirs, la quantité de BMP-2 utilisée peut être optimisée à une dose minime (200ng.mL^{-1}) et nécessaire. De ce fait, cette technologie permet de réduire les coûts mais aussi les risques de produire des effets secondaires néfastes dus à une surdose de BMPs. Enfin, grâce à la technologie des nanoréservoirs, l'accès de la molécule active aux cellules pourrait être contrôlé et adapté à différents tissus et organes. Notre technologie est basée sur un relargage actif dépendant du contact cellulaire, de la dégradation enzymatique et de la libération ainsi contrôlée des molécules thérapeutiques emprisonnées dans les nanoréservoirs.

L'utilisation des membranes fines dotées de nanoréservoirs actifs est d'ailleurs envisageable pour d'autres domaines d'application. Cette stratégie peut être utilisée avec différents principes actifs chargés. Il est envisageable d'appliquer cette technologie pour l'innervation de la pulpe dentaire par exemple (**Annexe 1**). D'autres travaux ont également été menés pour développer des structures nanofibreuses composites à base de PCL et de gels de collagène. Ces structures composites permettent à la fois d'assurer la tenue mécanique via le PCL et de mimer la phase organique de la MEC grâce au collagène (**Annexe 2**). Après deux mois d'implantation *in vivo*, les résultats montrent clairement de meilleures propriétés mécaniques pour l'implant composite PCL/collagène fonctionnalisé en comparaison à l'implant PCL fonctionnalisé seul (**Annexe 2**). Les tests mécaniques montrent d'ailleurs de l'os nouvellement formé et minéralisé au sein de l'implant composite fonctionnalisé.

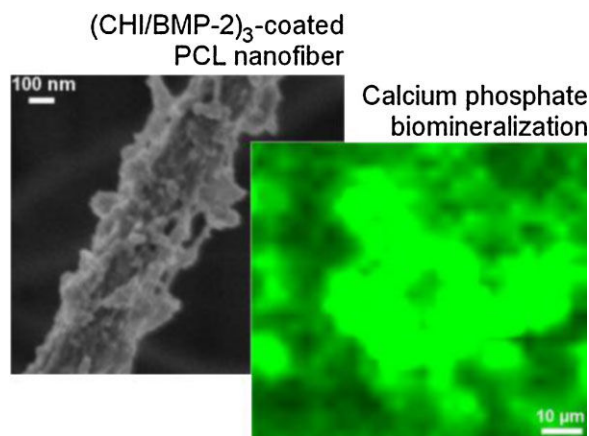
Toutefois, la membrane fine même fonctionnalisée est limitée par sa finesse à la régénération de lésions osseuses de petite taille et de faible profondeur (moins d'1 mm de profondeur). C'est pourquoi, nous avons cherché à développer une structure similaire mais plus épaisse.

Le travail suivant décrit le développement d'un nouveau type de structure nanofibreuse synthétique conçu pour la régénération osseuse : les « implants 3D ».

Osteogenetic Properties of Electrospun Nanofibrous PCL Scaffolds Equipped With Chitosan-Based Nanoreservoirs of Growth Factors

Alice Ferrand, Sandy Eap, Ludovic Richert, Stéphanie Lemoine, Deepak Kalaskar, Sophie Demoustier-Champagne, Hassan Atmani, Yves Mély, Florence Fioretti, Guy Schlatter, Liisa Kuhn, Guy Ladam,* Nadia Benkirane-Jessel*

Bioactive implants intended for rapid, robust, and durable bone tissue regeneration are presented. The implants are based on nanofibrous 3D-scaffolds of bioresorbable poly- ϵ -caprolactone mimicking the fibrillar architecture of bone matrix. Layer-by-layer nano-immobilization of the growth factor BMP-2 in association with chitosan (CHI) or poly-L-lysine over the nanofibers is described. The osteogenetic potential of the scaffolds coated with layers of CHI and BMP-2 is demonstrated in vitro, and in vivo in mouse calvaria, through enhanced osteopontin gene expression and calcium phosphate biomineralization. The therapeutic strategy described here contributes to the field of regenerative medicine, as it proposes a route toward efficient repair of bone defects at reduced risk and cost level.



Dr. A. Ferrand, S. Eap, Dr. S. Lemoine, Dr. F. Fioretti,
Dr. N. Benkirane-Jessel
INSERM UMR 1109, Osteoarticular and Dental Regenerative
Nanomedicine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex,
France

E-mail: nadia.jessel@inserm.fr

Dr. A. Ferrand, Prof. G. Schlatter

Institut de Chimie et Procédés pour l'Énergie, l'Environnement et
la Santé, ICPEES-UMR 7515, Université de Strasbourg, CNRS,
Institut Carnot MICA, École Européenne de Chimie, Polymères et
Matériaux, 25 rue Becquerel, 67087, Strasbourg, cedex 2, France
S. Eap, Dr. S. Lemoine, Dr. F. Fioretti

Faculty of Dentistry, University of Strasbourg, 1 place de l'Hôpital,
67000 Strasbourg, France

Dr. L. Richert, Prof. Y. Mély

CNRS UMR 7213, Biophotonics and Pharmacology Laboratory,
Faculty of Pharmacy, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch-
Graffenstaden, France

Dr. D. Kalaskar, Prof. S. Demoustier-Champagne

Bio-and Soft Matter (BSMA), Institute of Condensed Matter and
Nanosciences (IMCN), Catholic University of Leuven (UCL), Croix
du Sud 1, Box 4, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

Dr. L. Kuhn

Department of Reconstructive Sciences, University of Connecticut
Health Center, Farmington, CT 06030-1615, USA

Dr. G. Ladam, Prof. H. Atmani

EA 3829 MERCI, Biophysics and Biomaterials Laboratory (La2B),
University of Rouen, Centre Universitaire d'Évreux, 1 rue du 7ème
Chasseurs, 27002 Evreux, Cedex, France

E-mail: guy.ladam@univ-rouen.fr

Dr. N. Benkirane-Jessel

CNRS UMR 7561, Department of Orthopaedic Surgery, University
Hospital of Nancy, 29 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny,
54035 Nancy, Cedex France

1. Introduction

Regeneration of dysfunctional or damaged tissues to restore their structure and function, constitutes a main challenge in modern medicine. It can be addressed through the rapidly developing, multidisciplinary field of tissue engineering, which aims to form new functional tissue using optimal combinations of cells (autologous, allogeneic, xenogeneic, genetically engineered, or stem cells) and tailored biophysical and biochemical milieus capable of directing the organization, behavior, and functions of cells (e.g., adhesion, morphology, proliferation, and differentiation). This approach requires the development of next-generation biomaterials that provide provisional bioactive 3D scaffolds capable of guiding the spatially and temporally complex multicellular processes of tissue formation and regeneration.^[1–7]

Biomimetic matrices inspired from the intricate nanofibrillar architecture of natural extracellular matrix (ECM) components have already shown remarkable success in tissue engineering applications,^[5,8–10] allowing for instance, reconstruction of a dog urinary bladder,^[9] or regeneration after brain injury in a mouse stroke model.^[10] However, it is established that durable tissue repair cannot be achieved with inert ECM-mimetic scaffolds. Ideally, scaffolds should also be equipped with bioactive molecules, including growth factors, angiogenic factors, differentiation factors, and bone morphogenetic proteins to accelerate specific ECM production and tissue integration, or drugs to prevent adverse biological response such as sepsis or cancer recurrence.^[11] To this end, strong benefits are expected from the combination of recent advances in i) the design of nanoengineered ECM analogues,^[12–15] and ii) strategies to enrich the surface of biomaterials with bioactive compounds.^[16–25]

Within this context, we report here on bioactive nanofibrous scaffolds designed to stimulate the regeneration of bone. Three current polymer processing technologies allow the fabrication of nanofibrous scaffolds: molecular self-assembly, thermally-induced phase separation, and electrospinning.^[15] By electrospinning, fibers down to the 10-nm scale in diameter, that is, in the range of fibers in the ECM can be prepared.^[12] We combined electrospun nanofibrous membranes (ENM) comprised of the FDA-approved poly- ϵ -caprolactone (PCL) polymer, with the osteogenetic growth factor bone morphogenetic protein 2 (BMP-2, also FDA-approved) confined atop the nanofibers by the layer-by-layer (LbL) method.^[17–26] The latter consisted of a repeated sequence of simple alternate immersions of the ENM scaffolds into a solution of a polycation, and a solution of BMP-2, with rinsing steps between adsorption steps.

In a recent study, we have reported on the osteogenetic properties of such scaffolds, using novel dendri-graft poly-L-lysines (DGL^{G5}) developed by COLCOM Company, as

polycationic LbL component associated to BMP-2.^[25] Here, we explored the use of two alternative biomimetic, FDA-approved, polycationic macromolecules of different structures, i) poly-L-lysine (PLL) as a linear polypeptide, and ii) chitosan (CHI) as a linear polysaccharide with bone regenerative properties,^[27,28] in order to explore the versatility of the LbL immobilization of BMP-2, and to progress toward biomedical applications.

We studied the LbL buildup of the BMP-2-based nanoarchitectures by means of quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D), and we inspected the structure of the modified ENM scaffolds with scanning electron microscopy (SEM). The osteogenetic potential of the BMP-2-loaded ENM scaffolds was assessed both in vitro and in vivo by studying cell morphology, proliferation and specific gene expression, and the extent of calcium phosphate (CaP) biomineralization.

2. Experimental Section

2.1. Materials

Poly- ϵ -caprolactone (MW 80 kDa), analytical grade, was purchased from Perstorp Caprolactone. It was dissolved in a mixture of dichloromethane/dimethylformamide (DCM/DMF 50:50 v/v) at 15% w/v and was stirred overnight before use. PLL (M_w 30–70 kDa) was from Sigma–Aldrich, CHI (Protasan UP CL 113, M_w 50–150 kDa) was from FMC Biopolymer (Norway), human recombinant BMP-2 was purchased from PeproTech and Alexa Fluor 488-BSA (bovine serum albumin) conjugate (BSA^{AF488}) was from Invitrogen. PLL (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), CHI (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), BMP-2 (200 ng mL⁻¹), and BSA^{AF488} (200 pM) solutions were prepared in saline buffer medium at pH 5.5 (0.04 M MES, 0.15 M NaCl).

2.2. Electrospinning

Electrospinning was used to fabricate the PCL ENM scaffolds. The PCL solution was poured into a 5 mL syringe and ejected through a needle with a diameter of 0.5 mm at a flow rate of 1.2 mL h⁻¹ delivered by a programmable pump (Harvard Apparatus). A high-voltage power supply (Spellman SL30P10) was used to set the needle voltage at 15 kV. Aluminum foils (20 $\times$ 20 cm²), connected to the ground at a distance of 17 cm from the needle, were used to collect $\approx$ 50- μm -thick ENM scaffolds. 14-mm diameter cylinders were cut using a sterile biopsy punch. The electrospun fibers were 544 $\pm$ 88 nm in diameter (mean over 50 fibers).

2.3. Quartz Cristal Microbalance With Dissipation Monitoring (QCM-D)

The QCM-D was operated with a D300 system (Q-Sense, Sweden) equipped with a QAF302 flow chamber and QSX301 gold-coated quartz crystal sensors. This technique measures the resonance frequency shifts Δf and the dissipation factor changes ΔD of the quartz crystal sensor upon material deposition.^[29] The LbL buildup

was performed by successive injections of polyelectrolyte or protein solutions (300 μL , with rest periods of 6 min) and rinsing buffer solution (500 μL , with rest periods of 6 min) through the flow chamber, and monitored in situ. Changes in the resonance frequencies were measured at the 3rd, 5th, and 7th overtones ($\nu = 3, 5, \text{ and } 7$) corresponding to the 15-, 25-, and 35-MHz resonance frequencies. A shift in Δf_i can be associated, in a first approximation, to a variation of the mass adsorbed onto the crystal through the Sauerbrey relation:^[30] $m = -C \times \Delta f_i / \nu$, where C is a constant characteristic of the crystal used ($C = 17.7 \text{ ng cm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$). Mean thicknesses of the equivalent uniform film were derived from mass values assuming a film density of 1.1 g cm^{-3} .^[31]

2.4. Buildup of the Layer-by-Layer (LbL) Films onto ENM Scaffolds

For the biological activity experiments, (PLL or CHI/BMP-2)_{*n*} (with *n* the number of bilayers as either 3 or 6), or (CHI/BSA)₆ nano-architectures were built up onto ENM scaffolds by alternating immersions for 15 min in the adequate polyelectrolyte or protein solutions (300 μL). After each deposition step the membranes were rinsed for 15 min with the buffer medium. All membranes were sterilized by 30-min exposure to UV light (254 nm, 30 W, distance 20 cm), and equilibrated in contact with 1 mL of serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) prior to cell culture.

2.5. Fluorescence Microscope and dSTORM Image Analysis

High resolution imaging of the ENM scaffold with nanoreservoirs containing BSA^{AF488} as a model for BMP-2 was performed using the direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM).^[32–34] An Olympus IX-71 inverted microscope with an objective-type total internal reflection fluorescence (TIRF) configuration and an oil-immersion objective was used (100 $\times$, NA 1.49, Olympus). A continuous-wave laser (488 nm, Spectra Physic) was focused at the back focal plane of the objective to attain TIRF excitation. The laser intensity was controlled by $\lambda/2$ and Glan-Taylor Polarizer (Thorlabs). The fluorescence was collected by the same objective, filtered with appropriate set filters (488 nm Notch, LP 488/BP 525/45, Semrock), and imaged onto a 512×512 pixels region of a back illuminated EMCCD camera (Hamamatsu). The image stacks were obtained with samples in fresh $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ β -mercaptoethylamine (MEA) solution at pH 7.4. These concentration and excitation power adjustments allowed a stochastic illumination of the fields at the frame rate of 33 Hz. For each measurement a stack of 15 000 images was performed. The conventional fluorescence images were taken immediately before dSTORM imaging with low excitation intensity to avoid affecting dSTORM imaging.

Direct stochastic optical reconstruction microscopy images were reconstructed and analyzed with the open source software rapidSTORM 2.20. Only fluorescent spots containing more than 500 photons from Alexa Fluor 488 dye were analyzed. By analyzing their ellipticity, multi-fluorophore events were discarded from further analysis. Typically, 1000 photons were detected per BSA^{AF488} molecule and frame. The full width at half maximum

(FWHM) of each Gaussian function was calculated to determine the optical resolution in the lateral direction.

2.6. Scanning Electron Microscopy Observation

Electrospun nanofibrous membranes scaffolds were gold-coated (Edwards Sputter Coater) and observed with a Philips XL-30 ESEM scanning electron microscope in conventional mode (high vacuum) with a Thornley–Everhart secondary electron detector. Cell interactions with electrospun membranes were also analyzed by SEM. Cell-seeded samples were fixed with 3% glutaraldehyde for 30 min at 4 °C, gently washed three times with PBS, gradually dehydrated with 20, 40, 80, and 100% ethanol each for 5 min, covered with hexamethyldisilazane, and finally left to dry overnight in a fume hood. The samples were then imaged using a field effect gun digital scanning electron microscope (FE-SEM, DSM 982 Gemini from LEO) operating at 1 kV.

2.7. Cell Culture

Human primary osteoblasts (HOB) were obtained from Cell Applications and cultured in D-MEM medium containing 50 U mL^{-1} penicillin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin, 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ amphotericin B, and 10% FBS (Life Technologies, Paisley, UK). The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured.

2.8. Cell Viability and Proliferation

2×10^4 human HOB cells were seeded on top of 14 mm-diameter ENM scaffolds ($n = 3$) placed on 24-well plates. Alamar Blue (Serotec) was used to assess cellular proliferation. The Alamar Blue test is a non-toxic, water-soluble, colorimetric redox indicator that changes color in response to cell metabolism. At day 3, 7, 14, and 21 cells were incubated in 10% Alamar Blue/D-MEM medium in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO_2 . After 4 h, 100 μL of incubation medium was transferred to 96-well plates and absorbances at 590 and 630 nm were measured to determine the percentage of Alamar Blue reduction. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney *U*-test. A probability *p*-value < 0.05 was considered significant to reject the null hypothesis.

2.9. Immunofluorescence

14 mm-diameter ENM scaffolds were seeded with 2×10^4 HOB cells. After 7 d of culture in standard medium, cells were fixed with 4% PFA during 1 h, rinsed three times with PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 h, then rinsed three times with PBS. Indirect immunostaining was performed after the fixation. The primary antibody used was the rabbit polyclonal anti-osteopontin (1:600, Abcam) incubated during 3 h for bone detection. The secondary antibody was goat anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 488 (1:250, Invitrogen) incubated overnight. For nuclear staining, an incubation with DAPI (200 nm, Sigma) was performed for 5 min. After three rinses with PBS, cells were mounted on microscope slides using

Vectashield (Vector) and imaged by a microscope equipped for fluorescence (LEICA DM4000B).

2.10. In Vitro Examination of Mineralization Using a Fluorescent Dye

Cells were cultured on the ENM scaffolds for a 16-d period in the presence of mineralization medium [cell culture medium + β -glycerophosphate (10 mmol L^{-1} , Sigma) + ascorbate-2-phosphate ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma) + dexamethasone (10 nmol L^{-1} , Sigma)]. Calcium chelating dye xylenol orange (Sigma) was dissolved in distilled water to make a 20 mM stock solution. Xylenol orange was added to medium overnight to a final concentration of $20 \mu\text{M}$ and applied 12–18 h before imaging. Before examination with a LEICA DM4000B microscope, the samples were rinsed with fresh medium without fluorochrome to avoid non-specific fluorescence.

2.11. In Vivo Implantation in Murine Calvarial Bone Defects

All procedures were performed with prior received ethical approval and carried out in accordance with the regulations laid down for the animals. Accreditation number of the investigator is Préfecture Bas-Rhin, France: 67-315. NMRI-nude mice were used for the study (Janvier, France). Mice were anesthetized with isoflurane gas and operated on using strict aseptic procedure. A skin incision was made with a scalpel and a bony defect was created using an electric drill with a sterile round bur under irrigation of sterile normal saline, followed by placement of an ENM scaffold of 5 mm in diameter that was sutured to the periosteum with Ethicon 9/0 to prevent migration of the scaffold out of the defect. The skin was closed with sutures. After one month of implantation, the mice were euthanized with an intra-peritoneal injection of a lethal dose of ketamine and the samples were collected for analysis.

2.12. Histological Examination of Bone Regeneration Using Mallory Coloration

After 1-month in vivo implantation in mouse calvaria, the ENM scaffolds were extracted, fixed with Bouin Hollande solution for 2 d, dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, cleared with toluene, and embedded in paraffin wax. Sections were cut at $7 \mu\text{m}$ using a sledge microtome and mounted on glass slides. After the removal of paraffin wax, the sections were stained using Mallory trichrome coloration during 2 d.

2.13. Confocal Raman Microspectroscopy

After 21-d in vitro incubation with HOB cells in mineralization medium, or 1-month in vivo implantation in mouse calvaria, the ENM scaffolds were fixed with 4% PFA and rinsed with PBS. The scaffolds were rinsed with water and dried under gentle flow of argon prior to analysis by confocal Raman microspectroscopy for biomineralized CaP detection. Raman measurements were carried out in air by using a confocal Raman microspectrometer composed

of a Raman spectrometer (LabRam HR by Jobin-Yvon Horiba with a $600 \text{ lines mm}^{-1}$ grating) coupled to a microscope (Model BX41, Olympus) with xyz mapping stage via optical fibers. The excitation of Raman scattering was operated with a helium–neon laser at a wavelength of 632.8 nm . The laser beam was focused on the sample by means of a $\times 50$ LDW microscope objective. Confocal pinholes of $400 \mu\text{m}$ diameter for single spectra, and $250 \mu\text{m}$ diameter for 2D mappings placed before the entrance slit were used to reject Raman signal from out-of-focus planes. Raman spectra with good signal-to-noise ratio were recorded with an integration time of 60 s for single spectra and 20 s for 2D mappings.

3. Results and Discussion

The effective buildups of both PLL/BMP-2 and CHI/BMP-2 LbL architectures onto gold-coated substrates were demonstrated by QCM-D up to six adsorption cycles (Figure 1). Although QCM-D sensors are different from the ENM scaffolds, this technique is widely employed in a first approach to elucidate LbL buildup mechanisms.^[18–23,25,31] The normalized frequency curves ($\Delta f_i/\nu$) of the different overtones were superimposed (data not shown), meaning that the deposits were rigid enough to allow the application of the Sauerbrey relation.^[30,31] One can note that both systems followed distinct, respectively, exponential (PLL) and linear (CHI), growth regimes. It has been established that exponential growth of LbL deposits occurs when at

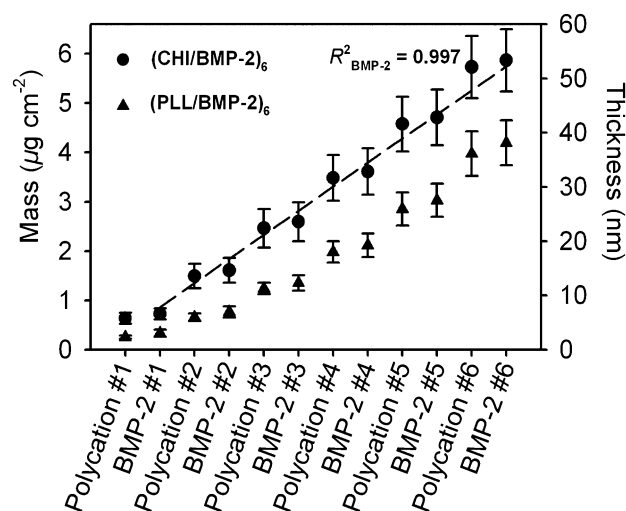


Figure 1. Evolutions of the mean wet mass and hydrodynamic thickness during the buildup of (CHI/BMP-2)₆ and (PLL/BMP-2)₆ LbL nanoarchitectures onto gold-coated quartz sensors followed by quartz crystal microbalance (QCM-D). Error bars represent the standard errors between two distinct experiments. The dotted line represents the linear regression fit over the BMP-2 values obtained during the buildup of the CHI-based architectures, and is accompanied by the corresponding determination coefficient R^2 .

least one of both LbL components is allowed to diffuse across the LbL architecture.^[35] The difference of growth regime observed here can be explained by the low flexibility/high persistence length (6–12 nm) of CHI chains,^[36] leading to linear growth due to impaired diffusion, while the high flexibility/low persistence length (2 nm) of PLL chains,^[37] is likely to allow diffusion through the LbL nanoarchitecture.

In spite of distinct growth regimes, both systems led to roughly similar immobilized amounts (hydrated masses) of BMP-2: ≈ 0.30 and $\approx 0.33 \mu\text{g cm}^{-2}$ for (PLL/BMP-2)₃ and (CHI/BMP-2)₃ nanoarchitectures, respectively; ≈ 0.83 and $\approx 0.73 \mu\text{g cm}^{-2}$ for thicker (PLL/BMP-2)₆ and (CHI/BMP-2)₆ nanoarchitectures, respectively (Table 1). The latter values are about twofold lower than those obtained with DGL^{G5},^[25] which must be due to more numerous interactions of the protein with the large, open DGL^{G5} dendrimers (≈ 16 nm in diameter) than with the linear, more flexible, and coilable structures of PLL and CHI chains.

With an isoelectric point of 8.5,^[38–41] BMP-2 has a positive global charge in the buildup conditions (pH 5.5). This is an amphoteric elongated protein with a positively charged central domain and negatively charged domains at both extremities.^[42] PLL and CHI have pK_a values of 10.5 and 6.5, respectively, therefore at pH 5.5 most of their amine moieties are protonized, such that PLL and CHI are also positively charged. Considering the repulsive electrostatic interactions between similarly charged PLL or CHI, and BMP-2, the effective buildup of LbL architectures comprised of these macromolecules may appear, in a first approach, as rather unexpected; however additional mechanisms governing the LbL buildup process must be considered.

Noteworthy, it has been previously demonstrated that proteins can adsorb in significant amounts onto LbL films, even when the outer polyelectrolyte and the adsorbing protein have similar charges.^[43,44] In addition, Pargaonkar et al.^[45] reported the effective buildup of LbL films comprised of the polycationic poly(dimethyldiallylammonium chloride) (PDDA) and the positively charged protein gelatin A. These authors explained their results by i) the local charge imbalances in the amphoteric gelatin A allowing it to be layered with the strongly positively charged PDDA, and ii) an entropically driven association process known to govern the interactions of proteins

with polyelectrolytes and nucleic acids: the association is accompanied by a loss of chain conformational entropy of the polyions combined with a release of their counterions during the formation of charge/charge interactions.^[46] The loss of conformational entropy of the chains is compensated for by a gain in entropy due to the release of the counterions. A similar mechanism is likely to be involved here in the buildup of PLL/BMP-2 and CHI/BMP-2 systems.

It was also reported that super hydrophilic carbon nanotubes retained larger amounts of BMP-2 than super hydrophobic ones, showing that BMP-2 readily establishes H-bondings.^[47] The polypeptide PLL and the polysaccharide CHI are also prone to H-bonding through their numerous amine and/or hydroxyl moieties. Many LbL systems were shown to be governed by simple H-bonding.^[48] Thus, H-bonding is likely to also crucially contribute to the LbL assembly of BMP-2 with PLL and CHI.

The phenomenon may also be explained by a surface pH change induced by the outer LbL layer, through electrostatic repulsion or attraction of the surrounding free protons.^[49] An outer positively charged layer of PLL or CHI is thus expected to repel free protons, inducing a local increase of the surface pH. This effect must decrease the global positive charge, or even provoke a global charge reversal of the BMP-2 molecules near the surface, which in turn, reduces or cancels the repulsive barrier between PLL or CHI, and BMP-2. This may allow the growth factor to approach the surface and to establish optimized H-bonds with the outer PLL or CHI molecules.

The effective deposition, and nanoscale dimensions, of both types of LbL architectures onto ENM scaffolds were confirmed by means of SEM (Figure 2). While the pristine nanofibers displayed a smooth topography (PLL/BMP-2)₃-treated and (CHI/BMP-2)₃-treated nanofibers were coated with uniformly distributed nanostructured deposits. Interestingly, both systems led to two distinct morphologies of the deposits. While PLL-based deposits consisted of spheroid nanocontainers similar to those obtained with DGL^{G5} in our previous study (Figure 2C,D),^[25] CHI-based deposits had a fish scale-like morphology (Figure 2E,F). Distinct morphologies can be explained again, by the low flexibility/high persistence length of the CHI chains, limiting the interactions with BMP-2 and resulting in the open, fish scale-like morphology, while the high flexibility/low persistence length of the PLL chains allowed optimized interactions with BMP-2 molecules leading to a more compact, spheroid morphology. It is well-established that substrate nanotopography is a crucial parameter governing cell behavior. The choice of the polycation and its associated nanotopography might thus have an impact on cell behavior. As reported before, good osteogenesis was obtained with spheroid, DGL^{G5}-based nanoreservoirs of BMP-2.^[25]

Table 1. BMP-2 mass quantification of two different LbL architectures: (PLL/BMP-2)_n and (CHI/BMP-2)_n as derived from the QCM-D measurements reported in Figure 1.

	$M_{\text{BMP-2}}, n = 3$ [ng cm ⁻²]	$M_{\text{BMP-2}}, n = 6$ [ng cm ⁻²]
(PLL/BMP-2) _n	301 ± 100	831 ± 135
(CHI/BMP-2) _n	331 ± 10	728 ± 19

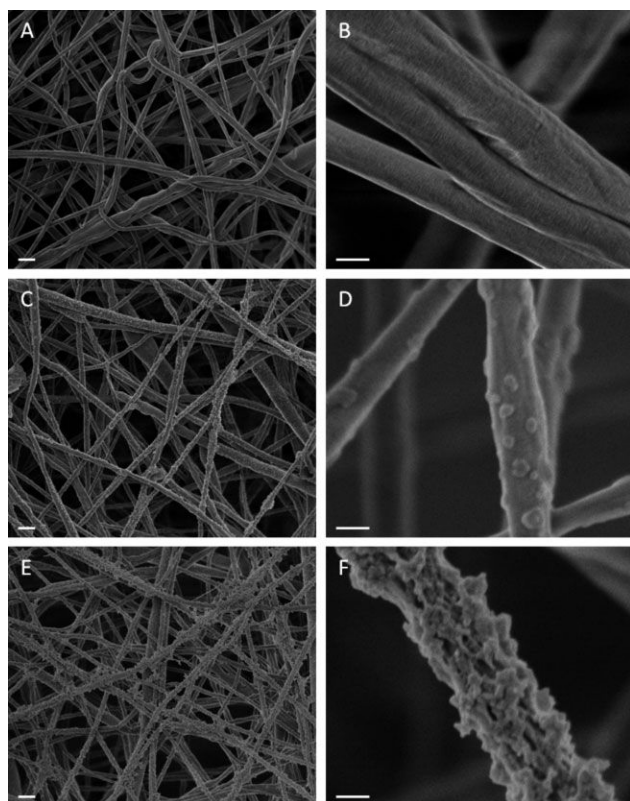


Figure 2. SEM visualization at different magnifications of the electrospun PCL nanofibers (A,B) before LbL treatment, (C,D) after the deposition of (PLL/BMP-2)₃ spheroid nanoarchitectures, and (E,F) after the deposition of (CHI/BMP-2)₃ fish scale-like nanoarchitectures. Scale bars: A,C,E) 1 μm and B,D,F) 100 nm.

As a complementary approach to know the distribution of the PLL-based and CHI-based protein-containing LbL deposits over the PCL nanofibers, we used BSA^{AF488} as a model of BMP-2, and we observed the scaffolds by fluorescence microscopy (Figure 3). For both polycations, the effective immobilization of the protein was verified, as revealed by the strong fluorescence detected. In conventional mode of observation, the LbL architectures seemed uniform without any texture or discontinuities as a consequence of the diffraction limit (Figure 3A–D). To avoid this limitation, we employed the super-resolution microscopy approach *d*STORM.^[32–34] In the presence of a thiol reducing agent in solution, stochastic fluorescent events in the field were obtained with a single-molecule setup. After analysis of a 15 000 image stack with rapidSTORM software, images with a resolution below 50 nm were constructed (Figure 3E–H). These observations, performed in physiological environment (PBS, pH 7.4), confirmed the confinement of the model protein within the form of punctate nanoreservoirs dispersed over the nanofibers. In the following, we will focus on the biological activity of the BMP-2-enriched scaffolds, both *in vitro* and *in vivo*.

Human osteoblasts (HOB cells) morphology after 24-h culture was clearly different on (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds compared to pristine ENM scaffolds, as shown by larger, far more spread, and elongated cells anchored to nanofibers through numerous filopodia extensions (Figure 4). At this stage, this result was favorable, as spreading, elongation, and filopodia formation have been

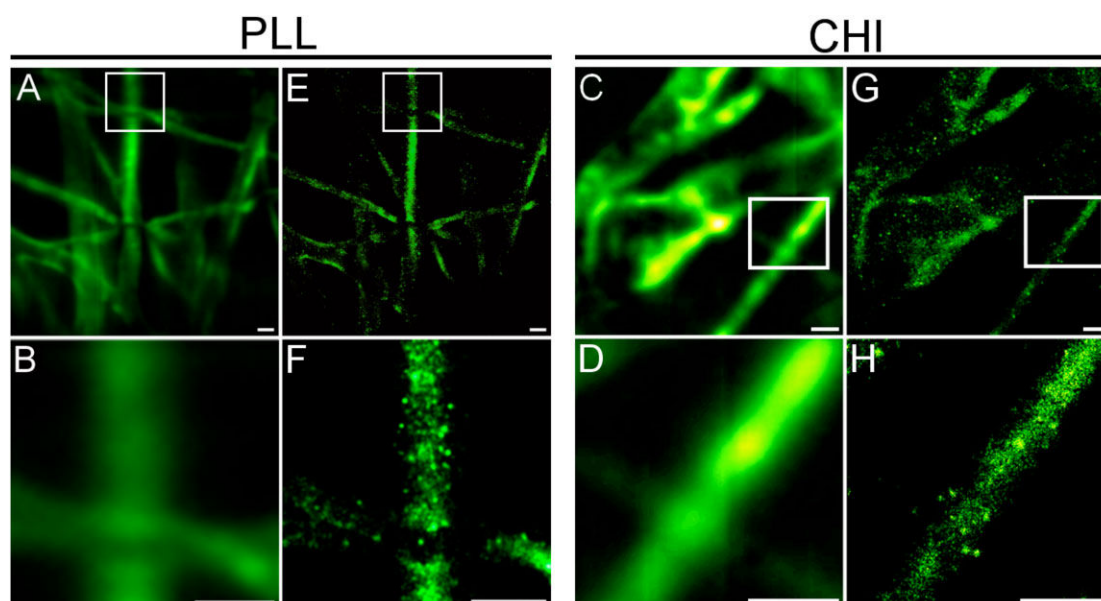


Figure 3. Fluorescent microscopy images of PCL electrospun nanofibers after treatment with (PLL or CHI/BSA^{Alexa Fluor 488})₆: conventional A–D) and corresponding *d*STORM E–H) images. B, D, F, H) Close-ups of the regions in the white-framed boxes in (A, C, E, G), respectively. Scale bars: 1 μm.

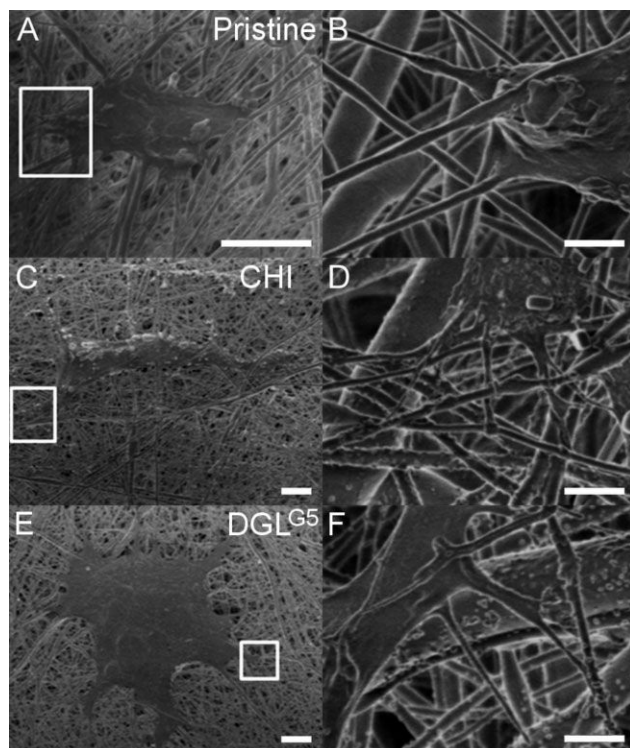


Figure 4. Typical morphologies of HOB cells after 24 h of culture onto A) a pristine ENM scaffold, C) a (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffold, and E) a (DGL^{G5}/BMP-2)₃-treated ENM scaffold (scale bars: 10 μm). Different magnifications were chosen due to the enhanced cell spreading on top of the LbL-functionalized scaffolds. Images (B,D,F) were obtained in the white-framed areas in images (A,C,E), respectively (scale bars: 1 μm).

shown to increase activation and to promote osteogenetic behavior of osteoblast cells.^[50,51] We did not inspect the morphology of cells adhering onto (PLL/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds by SEM. One can note, however, that enhanced cell spreading and filopodia formation were also observed on top of (DGL^{G5}/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds presenting similar compact structure of the nanoreservoirs as the (PLL/BMP-2)₃-treated scaffolds (Figure 4E,F). In line with recently published data,^[52,53] morphology changes between cells adhering onto pristine or LbL-treated ENM scaffolds were likely to be due to the combined modifications of both the surface chemistry and the nanotopography resulting from the LbL treatment.

Human primary osteoblast (HOB) cells showed similar, favorable increasing proliferation over a period of 21 d in culture onto both pristine and (PLL/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds (Figure 5). A slightly lower cell proliferation was measured beyond 7 d of culture onto (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds. If considered alone, the latter result is ambiguous, as it may reveal either an impairment of cell proliferation, or more favorably, a promotion of the phenotypic switch between proliferative and

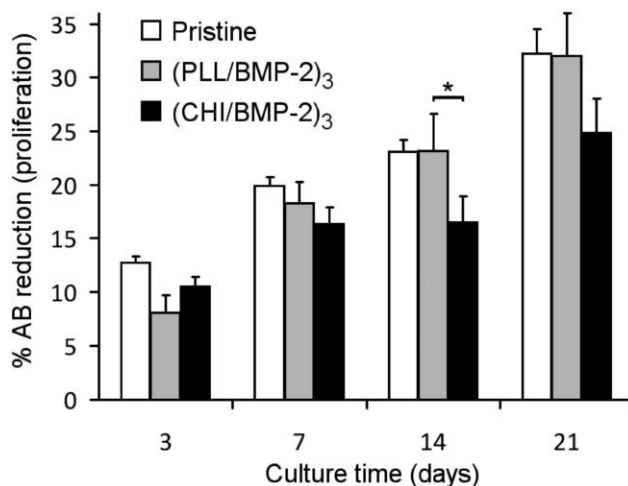


Figure 5. In vitro proliferation of HOB cells grown on top of pristine (PLL/BMP-2)₃-functionalized, and (CHI/BMP-2)₃-functionalized ENM scaffolds, after 3, 7, 14, and 21 d. Bars represent standard errors. The star stands for statistical significance ($p < 0.05$).

differentiated cells in the presence of CHI-based BMP-2 nanoreservoirs. As a first approach to evaluate the potential of the scaffolds to promote cell differentiation, the in vitro osteopontin gene expression by HOB cells was inspected by immunochemistry after 7 d of culture (Figure 6). Osteopontin gene expression was clearly promoted in the presence of BMP-2, with a best promoting effect for cells cultured onto the scaffolds equipped with CHI-based compared to PLL-based nanoreservoirs. As a negative control, we have also treated PCL scaffolds with (CHI/BSA)₃ architectures using the inert protein BSA instead of BMP-2. We verified the total absence of osteopontin expression by HOB cells cultured onto these scaffolds.

In order to study more deeply the capacity of the BMP-2-enriched ENM scaffolds to promote the expression of the osteogenetic phenotype of HOB cells in vitro, they were analyzed by confocal Raman microspectroscopy to detect CaP deposition, after 21 d of culture in mineralization medium (Figure 7A–C). Raman signatures were very similar for all the ENM scaffolds, except in the regions around 430–450 and 960–1010 cm⁻¹ relative to CaP, where signatures of the mineralized ENM scaffolds showed significant peaks proving the presence of CaP, contrary to the non-mineralized ENM scaffold (Figure 7A). Raman signatures of the latter displayed a weak peak at 963 cm⁻¹ relative to PCL, whose contribution to the CaP peak on mineralized membranes was negligible.^[54] The peaks at 430–450 cm⁻¹ (ν_2 PO₄³⁻) and 962 cm⁻¹ (ν_1 PO₄³⁻) revealed the presence of hydroxyapatite (HAp) and/or octacalcium phosphate (OCP), while the peak at 1005 cm⁻¹ was unambiguously attributable to OCP.^[55,56] For pure OCP

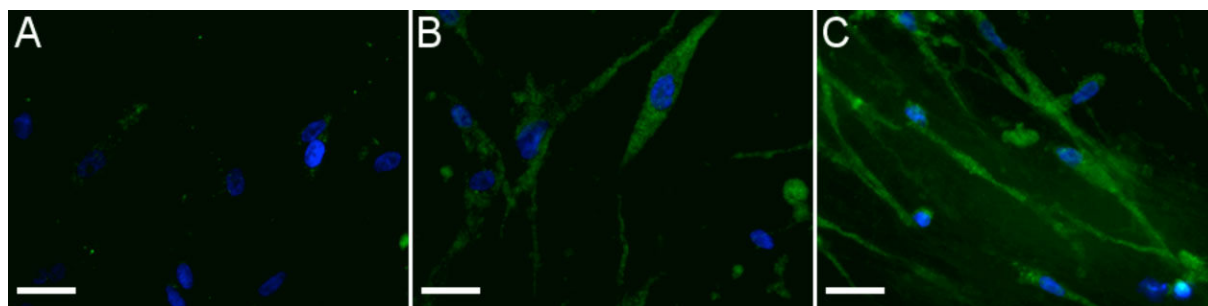


Figure 6. Osteopontin expression by HOB cells cultured for 7 d onto A) pristine, B) (PLL/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds, and C) (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds. Overlay of osteopontin (green) and nucleus (blue) staining. Scale bars: 20 μm. No osteopontin induction was detected by using (CHI/BSA)₃-treated ENM scaffolds as a negative control.

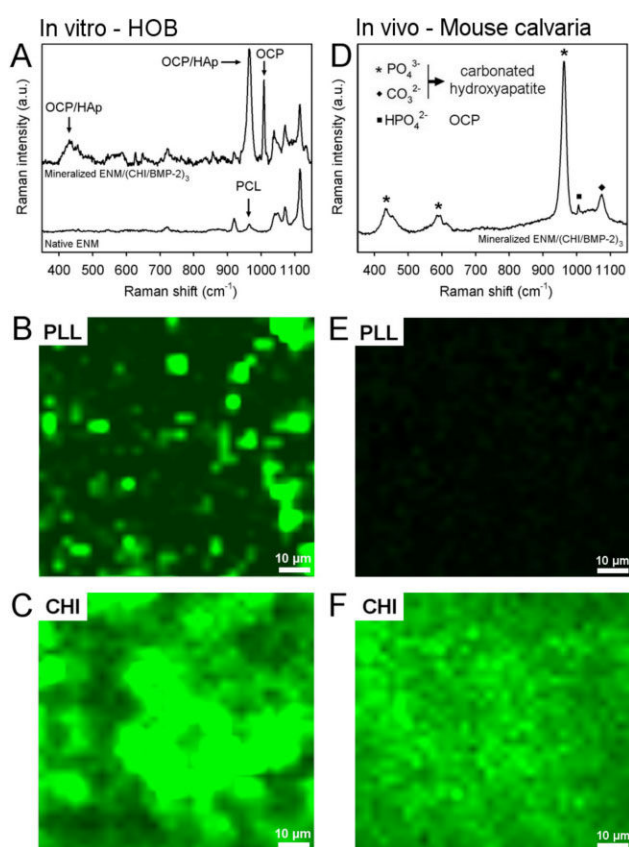


Figure 7. Raman analysis of ENM scaffolds after mineralization (left) in vitro by 21-d incubation with HOB cells in adequate medium, and (right) in vivo after 30-d implantation in mouse calvaria. A) Typical Raman spectra obtained from (down) a non-mineralized pristine ENM scaffold, and (up) a mineralized (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffold (HAp, hydroxyapatite; OCP, octacalcium phosphate). Similar HAp/OCP signatures were also detected atop mineralized (PLL/BMP-2)₃-treated ENM scaffold. Spectra were offset for the sake of clarity. D) Typical Raman spectrum showing the in vivo biomineralization of calcium phosphate within the main form of carbonated HAp and, to a small extent, OCP. B,C,E,F) 2D mappings of the 962 cm⁻¹ Raman peak of calcium phosphate over the various mineralized ENM scaffolds (90 μm × 90 μm; mesh size 3 μm).

coating, a shoulder should be present at 966–970 cm⁻¹.^[55,56] The absence of shoulder was necessarily due to the overwhelming contribution of the HAp peak, which indirectly confirms the coexistence of HAp and OCP. The presence of OCP is not surprising as it is a possible intermediate phase or precursor during the formation of carbonated apatite.^[56–58] 2D mappings of the Raman peak intensity of CaP over the in vitro mineralized ENM scaffolds revealed massive CaP deposition all over the (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffold (Figure 7C), while a much lower amount of CaP was deposited in the presence of the (PLL/BMP-2)₃ nanoreservoirs (Figure 7B). Complementary xylene orange calcium staining performed on the most promising (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffold confirmed the enhanced calcium deposition in vitro compared to the pristine scaffold (Figure 8).

The osteogenetic potential of the (CHI or PLL/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds was also inspected in vivo, by 1-month implantation into mouse calvaria defects. Bone formation on the (CHI/BMP-2)₃-treated ENM implant was strongly supported by Raman analysis. Raman signatures consisted of bands at 430–450 cm⁻¹ (ν₂ PO₄³⁻), 580–610 cm⁻¹ (ν₄ PO₄³⁻), 962 cm⁻¹ (ν₁ PO₄³⁻) and 1072 cm⁻¹ (ν₁ CO₃²⁻ and ν₃ PO₄³⁻), which favorably, were relative to B-type, carbonated HAp (PO₄³⁻ substituted by CO₃²⁻), the major mineral component of bone (Figure 7D). The small peak at 1005 cm⁻¹ (HPO₄²⁻) was attributable to a minor fraction of OCP. The 2D mapping of the 962 cm⁻¹ Raman peak intensity revealed important in vivo biomineralization over the extracted (CHI/BMP-2)₃-treated ENM implant (Figure 7F), whereas no biomineralization was detected over the (PLL/BMP-2)₃-treated ENM implant (Figure 7E).

Complementary histological data after 1-month implantation in mouse calvaria were collected for the most promising (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffold, in order to observe the scaffold colonization by the host cells from the bone defect site, the osseointegration, and the new bone mineralization. To this end, Mallory trichrome coloration was used in order to distinguish between cell nuclei, ECM,

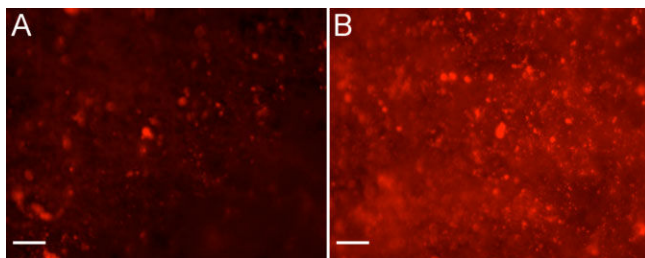


Figure 8. Xylenol orange calcium staining on A) pristine and B) (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds after 21-d culture of HOB cells. Scale bars: 50 μm.

and mineralized zones (Figure 9). The results are more promising for the (CHI/BMP-2)₃-treated implant than for the control untreated implant, with more homogeneous colonization by cells, better osseointegration as shown by the absence of fibrous capsule, and formation of a slightly mineralized ECM.

Together, our *in vitro* and *in vivo* evaluations supported the potency of the CHI-based LbL treatments in terms of biomineralization. The choice of the polycationic LbL component appeared to be of crucial importance to obtain effective improvement of osteogenesis. The better results obtained with CHI compared to PLL, must be due to better access by cells, to surface-immobilized BMP-2 molecules, certainly facilitated by the open, fish scale-like morphology of the (CHI/BMP-2)₃ deposits, in contrast to the compact morphology of the (PLL/BMP-2)₃ deposits. Also, the better osteogenesis obtained previously with compact (DGL^{G5}/BMP-2)₃ than with the (PLL/BMP-2)₃ nanoreservoirs tested here,^[25] might be due to i) the less coiled, more open structure of DGL^{G5} dendrimers than PLL chains, generating less numerous interactions and thus, less stabilized entrapment of the BMP-2 chains, and ii) the twofold higher

amount of growth factor embedded in the DGL^{G5}-based deposits.

The use of BMP-2 for bone regeneration applications is already approved by the European and American authorities. In particular, Medtronic offers InductOS, which consists of a basic collagen matrix of animal origin soaked in BMP-2 prior to administration. However, because degradation of BMP-2 occurs rapidly in aqueous solution, the soaking approach requires overdosing of BMP-2, which may induce adverse therapeutic side

effects.^[59] For InductOS, 12 mg BMP-2 are needed for a 7500 mm² membrane area, while our approach based on the LbL-based nanoimmobilization and protection of the growth factor required only 180 ng of BMP-2 (three adsorption steps from 0.3 mL of a 200 ng mL⁻¹ solution) for ≈600 mm² PCL membranes. This represented ≈5000-fold lower amount of growth factor per membrane unit area, compared to the implants currently used in the clinic, which is clearly beneficial both in terms of safety and cost level.

We have no specific data at this stage, concerning the exact mechanism by which BMP-2 was delivered to cells. However, since the protein was one of both LbL components, we can reasonably assume that its release could not occur without concomitant destruction of the nanoreservoirs, and it seems unlikely that significant passive release of the BMP-2 was allowed. This was supported by the stability of the QCM-D parameters upon rinsing of the LbL deposits with PBS buffer at pH 7.4, and also by the conservation of the BSA^{AF488} protein within the deposits analyzed by dSTORM in spite of a 7-d period of storage in solution. The release of the LbL-embedded BMP-2 was

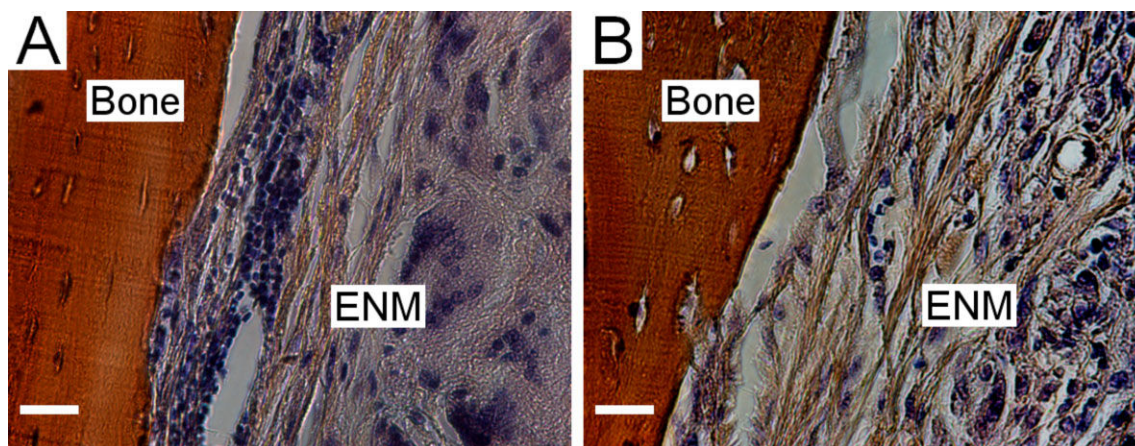


Figure 9. Histological study by Mallory trichrome staining of A) pristine and B) (CHI/BMP-2)₃-treated ENM scaffolds after 1-month implantation in mouse calvaria. Scale bars: 25 μm.

more likely mediated by enzymatic degradation of the nanoreservoirs following contact with cells, as was elucidated by our group and others for similar biomimetic LbL systems.^[17,21–24] On this basis, we propose the following tentative explanation to the improved osteogenic potential established for our BMP-2-enriched ENM scaffolds: BMP-2 was stabilized and protected by encapsulation with CHI chains. Upon contact with cells, cellular enzymes degraded the polysaccharide, and BMP-2 molecules were delivered to the cells. As the cells grew, divided, and infiltrated deeper into the porous structure of the scaffold, they provoked progressive release of BMP-2 that, in turn, further stimulated the cells. A release profile would however be complicated to establish because of the small amounts of BMP-2 used in these studies and because active osteoblasts may themselves produce BMP-2.

4. Conclusion

Toward a new approach for the improvement of bone regeneration, we investigated here the use of electrospun nanofibrous implants made of the bioresorbable PCL polymer that we functionalized with the BMP-2 growth factor. The LbL technology was implemented for the immobilization of BMP-2 atop PCL nanofibers in combination with CHI or PLL. This approach involved considerably reduced amounts of the bioactive compound compared to current methods, thus reducing the economic cost and the risks of adverse therapeutic side effects associated to BMP-2 overdosing. Promisingly, when BMP-2 was combined with CHI, this strategy ensured both availability to HOB cells and activity, of the surface-confined BMP-2, as shown by i) enhanced osteopontin gene expression and CaP biomineralization of the scaffolds in vitro, and ii) improved in vivo CaP biomineralization upon implantation in mouse calvaria. Complementary in vitro investigations with migrating, more precursor cell types than HOB cells, like embryonic stem cells for instance, might help to further generalize the potential of our scaffolds.

The possibility to continue the LbL buildup over the desired number of adsorption steps, illustrating the robustness and versatility of the method, might allow to tune the biological activity or kinetics of action of the implants by varying the deposits architecture, and thus to adapt the strategy to a range of bone regeneration applications. This approach could also be transferred to the immobilization of other growth factors, in view to design more sophisticated implants and to address the regeneration of other tissues.

Acknowledgments: A.F., S.E., and L.R. contributed equally to this study. This work was supported by the project NanoOSCAR from

the “Agence Nationale de la Recherche, ANR,” the project NeoTissage from the CNRS and “Alsace contre le Cancer.” N.J. is indebted to CHU de Nancy, Hôpital Central, “Chirurgie Orthopédique et Traumatologie” (Contrat d’interface INSERM vers l’hôpital). G.L. and H.A. thank the “Grand Évreux Agglomération” and the “Conseil Général de l’Eure” for partial financial support of La2B. L.T.K. would like to acknowledge receipt of a Burroughs Wellcome Fund 2012 Collaborative Research Travel Grant. The authors thank Prof. M. F. Rubner (Department of Materials Science and Engineering, Massachusetts Institute of Technology), and Prof. D. Mainard (Hôpital Central–Service de Chirurgie Orthopédique, and CNRS UMR 7561, Nancy), for helpful scientific discussions.

Received: June 7, 2013; Revised: July 11, 2013; Published online: August 19, 2013; DOI: 10.1002/mabi.201300283

Keywords: biomimetic; bone morphogenetic protein; bone regeneration; layer-by-layer; poly(ϵ -caprolactone)

- [1] N. A. Peppas, R. Langer, *Science* **1994**, *263*, 1715.
- [2] J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **1995**, *13*, 565.
- [3] L. G. Griffith, G. Naughton, *Science* **2002**, *295*, 1009.
- [4] E. L. Chaikof, H. Matthew, J. Kohn, A. G. Mikos, G. D. Prestwich, C. M. Yip, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *961*, 96.
- [5] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, *428*, 487.
- [6] C. Yang, P. J. Hillas, J. A. Báez, M. Nokelainen, J. Balan, J. Tang, R. Spiro, J. W. Polarek, *BioDrugs* **2004**, *18*, 103.
- [7] G. Kumar, C. K. Tison, K. Chatterjee, P. S. Pine, J. H. McDaniel, M. L. Salit, M. F. Young, C. G. Simon, Jr., *Biomaterials* **2011**, *32*, 9188.
- [8] T. Dvir, B. P. Tinko, D. S. Kohane, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 13.
- [9] F. Oberpenning, J. Meng, J. J. Yoo, A. Atala, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 149.
- [10] K. I. Park, Y. D. Teng, E. Y. Snyder, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1111.
- [11] R. Porter, T. T. Ruckh, K. C. Popat, *Bone Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 1539.
- [12] E. Kenawy, J. M. Layman, J. R. Watkins, G. L. Bowlin, J. A. Matthews, D. G. Simpson, G. E. Wnek, *Biomaterials* **2003**, *24*, 907.
- [13] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1171.
- [14] C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland, D. G. Simpson, G. L. Bowlin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 1413.
- [15] L. A. Smith, X. Liu, P. X. Ma, *Soft Matter* **2008**, *4*, 2144.
- [16] H. S. Yoo, T. G. Kim, T. G. Park, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 1033.
- [17] J. J. P. van den Beucken, X. F. Walboomers, O. C. Boerman, M. R. J. Vos, N. A. J. M. Sommerdijk, T. Hayakawa, T. Fukushima, Y. Okahata, R. J. M. Nolte, J. A. Jansen, *J. Controlled Release* **2006**, *113*, 63.
- [18] N. Jessel, M. Oulad-Abdelghani, F. Meyer, P. Lavalle, Y. Haykel, P. Schaaf, J. C. Voegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 8618.
- [19] D. M. Lynn, *Soft Matter* **2006**, *2*, 269.
- [20] M. Dierich, E. Le Guen, N. Messadeq, P. Netter, P. Schaaf, J. C. Voegel, N. Jessel, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 693.
- [21] S. Müller, G. Koenig, A. Charpiot, C. Debry, J. C. Voegel, P. Lavalle, D. Vautier, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1767.
- [22] T. Crouzier, K. Ren, C. Nicolas, C. Roy, C. Picart, *Small* **2009**, *5*, 598.

- [23] B. S. Kim, S. W. Park, P. T. Hammond, *ACS Nano* **2008**, *2*, 386.
- [24] F. Daubiné, D. Cortial, G. Ladam, H. Atmani, Y. Haykel, J. C. Voegel, P. Clézardin, N. Benkirane-Jessel, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6367.
- [25] C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, S. Facca, F. Fioretti, G. Ladam, S. Kuchler-Bopp, T. Regnier, D. Mainard, N. Benkirane-Jessel, *ACS Nano* **2012**, *6*, 483.
- [26] G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232.
- [27] A. Di Martino, M. Sittinger, M. V. Risbud, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5983.
- [28] I. Y. Kim, S. J. Seo, H. S. Moon, M. K. Yoo, I. Y. Park, B. C. Kim, C. S. Cho, *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 1.
- [29] M. V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, B. Kasemo, *Phys. Scr.* **1999**, *59*, 391.
- [30] G. Sauerbrey, *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206.
- [31] K. Abdelkebiri, F. Gaudière, S. Morin-Grognet, G. Coquerel, B. Labat, H. Atmani, G. Ladam, *Soft Matter* **2011**, *7*, 9197.
- [32] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153.
- [33] S. Van De Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 991.
- [34] A. L. Jouonang, P. Didier, Y. Mély, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 1585.
- [35] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J. C. Voegel, P. Lavalle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12531.
- [36] H. Cölfen, G. Berth, H. Dautzenberg, *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 373.
- [37] D. A. Brant, P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2788.
- [38] M. Geiger, R. H. Li, W. Friess, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 1613.
- [39] T. Crouzier, K. Ren, C. Nicolas, C. Roy, C. Picart, *Small* **2009**, *5*, 598.
- [40] M. L. Macdonald, R. E. Samuel, N. J. Shah, R. F. Padera, Y. M. Beben, P. T. Hammond, *Biomaterials* **2011**, *32*, 1446.
- [41] S. Chen, X. Shi, H. Morita, J. Li, N. Ogawa, T. Ikoma, S. Hayakawa, Y. Shirosaki, A. Osaka, N. Hanagata, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2011**, *12*, 065003.
- [42] C. Scheufler, W. Sebal, M. Hülsmeier, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 103.
- [43] G. Ladam, C. Gergely, B. Senger, G. Decher, J. C. Voegel, P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 674.
- [44] G. Ladam, P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, J. C. Voegel, *Langmuir* **2001**, *17*, 878.
- [45] N. Pargaonkar, Y. M. Lvov, N. Li, J. H. Steenekamp, M. M. de Villiers, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 826.
- [46] V. Ball, M. Winterhalter, P. Schwinté, P. Lavalle, J. C. Voegel, P. Schaaf, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2357.
- [47] Z. J. Han, K. Ostrikov, C. M. Tan, B. K. Tay, S. A. F. Peel, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 295712.
- [48] W. B. Stockton, M. F. Rubner, *Macromolecules* **1997**, *30*, 2717.
- [49] A. F. Xie, S. Granick, *Macromolecules* **2002**, *35*, 1805.
- [50] K. S. Brammer, S. Oh, C. J. Cobb, L. M. Bjursten, H. van der Heyde, S. Jin, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 3215.
- [51] M. Hindié, M.-C. Degat, F. Gaudière, O. Gallet, P. R. Van Tassel, E. Pauthe, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 387.
- [52] K. Anselme, P. Davidson, A. M. Popa, M. Giazgon, M. Liley, L. Ploux, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3824.
- [53] I. Wheeldon, A. Farhadi, A. G. Bick, E. Jabbari, A. Khademhosseini, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 212001.
- [54] P. Taddei, A. Tinti, M. Reggiani, C. Fagnano, *J. Mol. Struct.* **2005**, *744*, 135.
- [55] B. O. Fowler, M. Markovic, E. W. Brown, *Materials* **2009**, *2*, 399.
- [56] S. V. Dorozhkin, *Materials* **2009**, *2*, 399.
- [57] P. Bodier-Houllé, P. Steuer, J. C. Voegel, F. J. G. Cuisinier, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1998**, *54*, 1377.
- [58] N. J. Crane, V. Popescu, M. D. Morris, P. Steenhuis, M. A. Ignelzi, *Bone* **2006**, *39*, 434.
- [59] E. J. Woo, *Spine J.* **2012**, *12*, 894.

Chapitre 3

Développement d'un implant nanofibreux 3D épais pour la régénération osseuse

- Eap S, Ferrand A, Mendoza-Palomares C, Hébraud A, Stoltz J-F, Mainard D, Schlatter G & Benkirane-Jessel N (2012) Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater Eng.* 22(1-3):137-41.
- Eap S, Morand D, Clauss F, Huck O, Stoltz J-F, Lutz J-C, Benkirane-Jessel N & Keller L (2014). Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce Bone. *Biomed Mater Eng.* In press.

3.1. Contexte et objectifs

Nous avons développé des membranes synthétiques et bioactives de PCL par electrospinning dans le but de remplacer les membranes de collagène (**Chapitre 2**) (Mendoza-Palomares et al., 2012). Cette membrane nanofibreuse, de part les contraintes du procédé, est nécessairement fine (de 50 à 500 μm d'épaisseur) et afin d'éviter toute confusion par la suite, nous l'avons nommé « membrane fine ». Ne dépassant pas les quelques millimètres d'épaisseur, l'application qui lui est destinée dans le domaine de la régénération osseuse concerne les petites lésions osseuses et de faible profondeur (Doshi and Reneker, 1995).

Notre nouvelle ambition a été de développer et d'optimiser la technique d'electrospinning afin d'augmenter l'épaisseur de la structure nanofibreuse et de permettre la régénération osseuse de petites et de grandes lésions osseuses. Nous présentons ainsi un nouveau type de structures électrospinnées appelées « implants 3D » par opposition aux membranes fines. La mise en œuvre est toujours réalisée à partir du même polymère : le polycaprolactone (PCL). L'objectif était en premier lieu la détermination des paramètres d'electrospinning adéquats pour l'élaboration des implants nanofibreux et des conditions nécessaires à la reproductibilité du procédé. Nous avons également montré le potentiel de ces implants à induire une régénération osseuse *in vitro*. Nous avons testé la cytotoxicité de ces implants en évaluant la viabilité cellulaire (adhésion et prolifération) une part, puis observé l'induction osseuse par immunofluorescence d'autre part. Des études chez la souris ont confirmé l'induction osseuse par l'implant nanofibreux et un début de minéralisation osseuse *in vivo*.

3.2. Résultats et discussion

3.2.1. Optimisation du procédé et production des implants 3D

L'optimisation des paramètres de l'electrospinning a permis de développer un implant nanofibreux de PCL d'une épaisseur moyenne de $10,5 \pm 0,16$ mm et d'une masse moyenne de

373 $\pm$ 22 mg. D'autre part, la distribution du diamètre des nanofibres est bimodale. En effet, le diamètre moyen des fibres est de 516 $\pm$ 59 nm, cependant environ 60% des fibres présentent en moyenne un diamètre compris entre 100 nm et 300 nm ce qui correspond à l'échelle de taille des fibres de collagène de la MEC. Cette distribution bimodale est principalement due à l'hétérogénéité de la solution de PCL provenant de l'addition du DMF dans la solution (Ahirwal et al., 2013). Le DMF est nécessaire afin d'empêcher l'encrassement en bout d'aiguille qui pourrait survenir en raison de l'évaporation trop rapide du DCM lors de l'électrospinning. Cette distribution bimodale est nécessaire à la croissance en hauteur de l'implant 3D.

L'observation au MEB d'une coupe transversale de l'implant 3D montre une structure « en couche » superposées de membranes fines et confirme sa nature nanofibreuse et biomimétique. En effet, en début d'expérience les nanofibres s'auto-assemblent et forment des structures ressemblant à des « nids d'abeilles ». Les nanofibres de diamètre important constituent les « murs » de ces nids tandis que les fibres les plus fines se déposent aléatoirement entre ces murs (Ahirwal et al., 2013). L'implant 3D peut ainsi croître en épaisseur par superposition aléatoire de membranes fines constituées de nanofibres fines reliant les « murs » de nanofibres plus épaisses. Cette superposition engendre des espaces entre les membranes fines et forme des « macropores » au sein de la structure nanofibreuse. Ces « macropores » font en moyenne 153 $\pm$ 19 μ m de hauteur et 486 $\pm$ 70 μ m de largeur. Leur taille est donc bien adaptée à l'usage de l'implant nanofibreux dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, la taille nécessaire des pores étant d'au moins 100 μ m (Karageorgiou and Kaplan, 2005).

D'autre part, la porosité mesurée est d'environ 93,5 %, ces implants 3D présentent une porosité importante adaptée à l'ingénierie tissulaire (Karageorgiou and Kaplan, 2005). Cependant, la principale limite de cet implant concerne la taille et la disposition des pores. En effet, la taille et la disposition des pores sont hétérogènes et difficiles à contrôler. Le résultat n'est que semi-contrôlé puisque les membranes sont reproductibles et très similaires mais non-identiques. En effet, bien que l'électrospinning soit un procédé de mise en œuvre simple et facile à utiliser, un grand nombre de paramètres peut faire varier et altérer l'implant final en terme de diamètre de nanofibres, de porosité, de taille et de distribution des pores. Les paramètres en question sont de différentes origines : solution de polymère, paramètres de l'appareillage, et conditions atmosphériques. Une fois les paramètres de la solution de polymère et de l'appareillage fixés, les conditions atmosphériques restent toutefois à être

contrôlées. Une fois l'atmosphère contrôlée en terme d'humidité et de température, le résultat obtenu par electrospinning sera beaucoup plus reproductible.

3.2.2. Potentiel des implants 3D: régénération osseuse

Afin de tester la cytotoxicité ainsi que le potentiel de l'implant en terme de régénération osseuse, un suivi de la prolifération et de l'activité d'ostéoblastes humains a été effectué *in vitro*. Deux méthodes différentes d'ensemencement ont été testées dans le but de déterminer la méthode la plus adaptée. La première méthode favorise un ensemencement des cellules directement sur la membrane alors que la seconde consiste à mettre en contact le milieu de culture contenant les cellules avec la membrane. Les deux méthodes montrent la non cytotoxicité de l'implant nanofibreux 3D. Les ostéoblastes ont adhéré et proliféré dans les deux cas, cependant la seconde méthode d'ensemencement (indirecte) a fourni une meilleure idée de l'évolution de la prolifération des ostéoblastes.

La structure interne des implants 3D rappelle celle des matrices de collagène. Le diamètre des fibres, la taille des pores et la porosité des implants sont tout à fait adaptés aux contraintes de l'ingénierie tissulaire. De plus, l'épaisseur des membranes pouvant être variée, cela permettrait la réparation de lésions de tailles différentes. D'autre part, les premiers résultats *in vitro* montrent que les implants 3D de PCL sont biocompatibles (viabilité cellulaire) et permettent l'adhésion et la prolifération d'ostéoblastes.

Afin de confirmer ces premiers résultats *in vitro*, l'adhésion et la morphologie cellulaire ont été observées sur les implants au MEB. Après 3 jours de culture cellulaire, les ostéoblastes présentent une morphologie branchée accompagnée de filopodes allongés en contact intime avec les nanofibres de l'implant. D'autre part, des études *in vivo* ont été réalisées chez la souris. Des implantations en calvaria ont été réalisées afin d'étudier en détail la biocompatibilité, la colonisation cellulaire et l'ostéointégration de l'implant nanofibreux. Après 2 semaines d'implantation, l'immuno-marquage de coupes d'implants calvaria réalisés chez la souris GFP (Green Fluorescent Protein) a montré une excellente colonisation cellulaire des ostéoblastes de l'hôte au sein de l'implant. Celui-ci a bien été intégré et accepté par l'organisme, confirmant ainsi la biocompatibilité de nos implants. De plus, l'immuno-marquage a également révélé l'expression d'ostéopontine par les ostéoblastes de l'hôte, signifiant que la régénération osseuse est en cours. Par ailleurs, l'observation de coupes

histologiques, après 4 semaines d'implantation, a confirmé la biocompatibilité des implants (ostéointégration et colonisation cellulaire). L'analyse histologique a également mis en évidence la vascularisation de l'implant et la synthèse matricielle provenant des ostéoblastes colonisant l'implant. Enfin, des zones de matrice osseuse nouvellement minéralisée ont également été détectées démontrant ainsi les propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices des implants nanofibreux 3D de PCL.

Il est à noter que malgré la semi-reproductibilité des implants en terme de taille de pores, les résultats montrent une reproductibilité dans les analyses *in vitro* et *in vivo*. Les cellules et l'organisme vivant sont donc capables de passer outre l'hétérogénéité en terme de taille et de disposition de pores. Il existe bien un seuil en terme de taille des pores et de porosité à partir duquel celui-ci est nécessaire et suffisant pour permettre la régénération osseuse (Karageorgiou and Kaplan, 2005). Nos résultats montrent que des pores d'environ 150 μm de hauteur et de 480 μm de largeur en moyenne sont suffisants pour la colonisation cellulaire de l'implant et la régénération du tissu osseux *in vivo*. Mais il serait également intéressant de poursuivre la recherche afin de découvrir si en augmentant de façon contrôlée la porosité et la taille des pores, et en contrôlant leur disposition au sein de l'implant, cela améliorerait les propriétés ostéoconductrices de l'implant et augmenterait sa capacité de recrutement cellulaire au site de la lésion.

Enfin, il est important de remarquer que ni la membrane fine, ni l'implant 3D avant chirurgie ne présentent de bonnes propriétés mécaniques. En effet, ils n'ont pas fonction de comblement osseux, ces biomatériaux ont pour but d'aider et d'accélérer la régénération osseuse. Les membranes fines de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) seront principalement utilisées pour la régénération de petites lésions osseuses. Au vu de l'épaisseur de ces membranes (de 50 à 500 μm d'épaisseur), les lésions osseuses concernées ne devront pas dépasser le millimètre de profondeur. Une autre application possible des membranes fines concerne la régénération osseuse guidée des applications maxillo-faciales. Les implants 3D épais ont pour fonction d'être utilisés dans le cadre de la régénération osseuse de lésions de taille intermédiaire. En effet, ces implants 3D pourraient aider à la régénération osseuse de lésions d'une profondeur de 1 cm et d'un diamètre pouvant atteindre jusqu'à 2,5 cm. Ces implants 3D pourraient également être utilisés en association avec les membranes fines pour des applications maxillo-faciales parodontales et orthopédiques.

3.3. Conclusion

Les implants nanofibreux 3D présentent une porosité et des nanofibres de taille adaptée à la régénération osseuse. Ces propriétés favorisent l'adhésion, l'infiltration et la prolifération *in vitro* des ostéoblastes au sein des implants. Les résultats *in vivo* confirment la biocompatibilité de l'implant 3D et démontrent que celui-ci possède la capacité d'induire une régénération osseuse par recrutement cellulaire de l'hôte au site de l'implantation. Par ailleurs, malgré la taille de l'implant, la colonisation cellulaire s'est faite sur toute son épaisseur suggérant ainsi que notre implant serait bien adapté à des lésions de tailles plus importantes.

Les perspectives sont nombreuses, tant concernant l'amélioration de la membrane 3D elle-même que concernant les études futures possibles dans le domaine de la médecine régénérative pour ce type de support. En effet, il était judicieux d'améliorer les propriétés ostéoinductrices de ces implants 3D en appliquant notre technologie de nanoréservoirs actifs.

L'étude qui suit porte sur l'analyse de l'effet des nanoréservoirs actifs combinés à l'implant 3D sur la vitesse de la régénération osseuse.

Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering

Sandy Eap^a, Alice Ferrand^{a,b}, Carlos Mendoza Palomares^a, Anne Hébraud^b,
Jean-François Stoltz^d, Didier Mainard^d, Guy Schlatter^b and Nadia Benkirane-Jessel^{a,c,d,*}

^a *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 977, Strasbourg, France*

^b *LIPHT (EAC 4379), Laboratoire d'Ingénierie des Polymères Pour les Hautes Technologies, CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

^c *Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

^d *Hôpital Central, Service de Chirurgie Orthopédique and CNRS UMR 7561, Nancy, France*

Abstract. Tissue engineering aims at developing functional substitutes for damaged tissues by mimicking natural tissues. In particular, tissue engineering for bone regeneration enables healing of some bone diseases. Thus, several methods have been developed in order to produce implantable biomaterial structures that imitate the constitution of bone. Electrospinning is one of these methods. This technique produces nonwoven scaffolds made of nanofibers which size and organization match those of the extracellular matrix. Until now, seldom electrospun scaffolds were produced with thickness exceeding one millimeter. This article introduces a new kind of electrospun membrane called 3D scaffold of thickness easily exceeding one centimeter. The manufacturing involves a solution of poly(ϵ -caprolactone) in DMF/DCM system. The aim is to establish parameters for electrospinning in order to characterize these 3D scaffolds and, establish whether such scaffolds are potentially interesting for bone regeneration.

Keywords: Tissue engineering, bone regeneration, electrospinning, 3D scaffold, nanofibers, polycaprolactone

1. Introduction

Improving health and healing conditions are the two major aims in medical research. Thus developing new kind of biomaterials and tissue regeneration are great research subject in the field of medical technologies. Every year, thousands of people suffer from bone defect due to trauma, bone diseases or cancer [1]. Organ transplantation being limited by the number of available donor and high process cost, many patient die from insufficient ideal bone substitute. Another concern is also about the size of some bone defects being too widespread, or for patients affected by osteoporosis with bone mass too low for the body to heal by itself, it is necessary to use bone substitute to help the regeneration process.

For this to be achieved, different methods have been developed to temporarily replace the damaged areas by a specific structure called scaffold. One of these methods is called electrospinning [2]. In the recent years, this method has been actively explored because of its process simplicity and adequate morphology of the obtained structure for tissue engineering. Indeed, electrospun scaffolds offers polymer

* Address for correspondence: N. Benkirane-Jessel, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 977, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg Cedex, France. Tel.: +33 3 68853376; Fax: +33 3 68853379; E-mail: nadia.jessel@inserm.fr.

fibers with diameter generally ranging from 100 nm to several μm leading to high specific area and microporous structure allowing fine cell adhesion, infiltration and proliferation. The features of such scaffold being morphologically very similar to extracellular matrix (ECM) of natural tissue, electrospun scaffolds present all the characteristics needed for tissue engineering.

Our strategy is to develop tridimensional and thick scaffolds that mimic the ECM as closely as possible by electrospinning. Indeed, electrospinning uses electric forces in order to form fibers from a charged polymer solution. The fibers characteristics (diameter, porosity, etc.) and structure morphology produced depend on the process parameter (high voltage, feed rate, etc.) and polymer solution characteristics (viscosity, conductivity, etc.) [3]. An extended review on poly(ϵ -caprolactone) (PCL) electrospun scaffold can be seen elsewhere [4]. PCL has been widely studied and used for different application in the medical field such as for sutures or under-skin contraceptive implant. It is nowadays a known biodegradable and biocompatible polymer that has been clinically approved by FDA (US Food and Drug Administration). Therefore, by changing different parameters we believe that it is possible to produce a 3D thick scaffold from a PCL solution which characteristics would be promising for tissue engineering.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Human osteoblast (hOB) cells were obtained from the cell line MG-63 coming from human osteosarcoma. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotics, fungizone, sodium pyruvate and trypsinethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from GIBCO Invitrogen, Cergy-Pontoise, France. PCL ($M_w = 80,000$) was generously provided by the LIPHT (Laboratoire d'Ingénierie Pour les Hautes Technologies), Cronenbourg, France.

2.2. Fabrication and characterization of PCL nanofibrous scaffold

PCL with a molecular weight of 80 kg/mol was purchased from Sigma-Aldrich and was dissolved in a solvent system (dimethylformamide : methylene chloride = 1:1 v/v) to achieve a 17-wt/v% solution. This solution was electrospun at a high voltage of 30 kV at the beginning of the process to create nanofibers then the voltage was increased regularly during the process up to 40 kV. The PCL solution was delivered at a feeding rate of 2 ml/h and a grounded aluminum collector plate was placed around 16 cm from the needle tips [5]. The ambient conditions were set to be around 30°C and 35% humidity. The produced nonwoven fabrics were kept overnight at 45°C in a desiccator to evaporate residual solvent.

The morphological and structural characterization of the electrospun scaffolds was carried out using scanning electron microscopy (SEM Hitachi TM1000). The fiber diameter and pore size were measured with Image J software. The porosity was estimated by weight and volume of the sample.

2.3. hOB cell culture

hOB cells were cultured in DMEM medium containing 10% FBS, 1% antibiotics, 1% fungizone, and 1% sodium pyruvate in 75 cm² flasks. The hOB culture was kept at 37°C in a humidified CO₂ incubator and fed every 3 days. Every 7 days hOBs were harvested by trypsin-EDTA treatment and replated.

2.4. hOB cell proliferation

Two methods have been tested. The first one (Method A) presented hOB cells (3×10^5 cells) seeded directly on sterilized thick scaffolds put in a 24-well plate. In the second method (Method B) conducted, hOB cells (2×10^4) were placed in suspension in DMEM medium then seeded on 24-well plates. The sterilized PCL scaffold was placed in the well among the hOB cells. Cell proliferation was monitored after 7, 14 and 21 days by alamarBlue® assay. This assay is based on detection of metabolic activity. The system incorporates an oxido-reduction indicator that changes color in response to chemical reduction of growth medium resulting from cell proliferation which can be detected at 570 and 630 nm. The scaffolds containing hOB cells were incubated with 10% alamarBlue® agent in medium culture for 4 h. Thereafter, aliquots were pipetted into 96-well plates and the samples were read in a spectrophotometric plate reader at 570 and 630 nm.

3. Results and discussion

3.1. Thick scaffolds and characterization of nanofibers

The electrospun nanofibers showed an average diameter of 516 ± 59 nm with about 60% of the fibers featuring diameters in the range of 100–300 nm. These randomly oriented nanofibers were able to form thick scaffolds (Fig. 1) which presented an average thickness and weight of 10.5 ± 0.16 mm and 373 ± 22 mg. The porosity was estimated at 93% which is highly adequate for tissue engineering, high porosity allowing cell infiltration and proliferation as well as nutriment transportation and waste elimination [7]. The structure and morphology of the thick scaffold were observed by SEM (Fig. 2). The fibrous architecture mimicked the ECM allowing hOB cells to attach and grow. Moreover a structure based on stratified “layers” can be observed. Indeed, with higher magnification, we can observe that each “layer” is a thin nonwoven fibrous mesh. The random superposition of these “layers” caused the heterogeneous distribution of what we call “macropores” which are large spaces observed between the “layers” in the



Fig. 1. Section of a PCL tridimensional electrospun thick scaffolds. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0699>.)

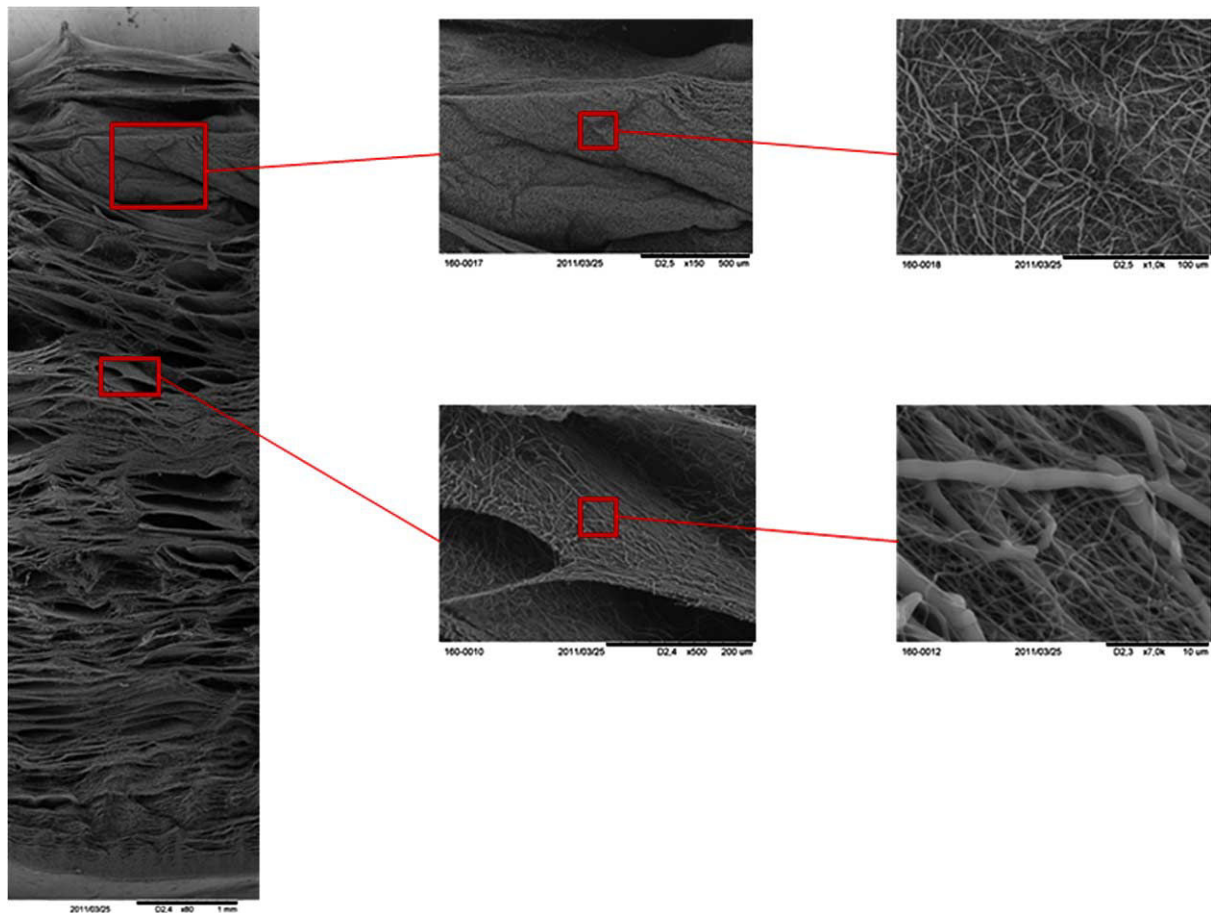


Fig. 2. SEM pictures showing the structure and morphology of an electrospun thick scaffold. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0699>.)

thick scaffold structure. The size of “macropores” has been measured; their average height and width were estimated to be 153 ± 19 and 486 ± 70 μm , respectively. Therefore, the size of the “macropores” is enough and adequate in tissue engineering since the needed pore size is a minimal of 100 μm .

3.2. Biological characterization

The thick scaffolds have been tested for cell proliferation in order to prove their potential application in tissue engineering and more specifically in bone regeneration. Results show (Fig. 3) that method A presented a low cell proliferation compared with method B which could be explained by the quantity of hOB cells seeded directly on the scaffold that was too high thus resulting in a certain cell mortality then a very weak proliferation. Method B expressed a better cell proliferation and a good cell activity although weaker than when using classical cell growing support. However, because of the experiment limitations and the new kind of structure which has never been tested before, the alamarBlue[®] results may have been minimized. Nevertheless, electrospun PCL 3D thick scaffolds can be considered biocompatible (cell viability) and allow hOB cell adhesion and proliferation.

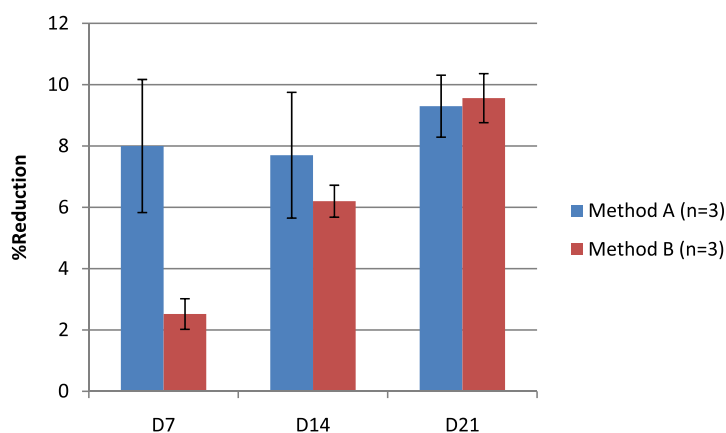


Fig. 3. Evolution of osteoblast cell proliferation and comparison between the two methods A and B. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0699>.)

4. Conclusion

Electrospun tridimensional thick scaffold based on PCL showed a structure mimicking the natural ECM. The scaffolds have porous nanofibrous morphology with a majority of fibers having diameters in the range of 100–300 nm, and present a thickness around 10.5 mm. Their porosity of 93% and size pore over 100 μm make them adequate for tissue engineering although the heterogeneous distribution of the pores might be a drawback to cell infiltration. The results of the biological tests show interesting hOB cell proliferation and activity and confirm the scaffolds biocompatibility. Overall, the results indicate that electrospun tridimensional thick scaffolds are adequate for tissue engineering and potential candidate for bone regeneration.

Acknowledgement

The authors acknowledge the support of the Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP).

References

- [1] D. Logeart-Avramoglou et al., Engineering bone: challenges and obstacles, *J. Cell. Mol. Med.* **9**(1) (2005), 72–84.
- [2] J. Doshi and D.H. Reneker, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *J. Electrostat.* **35** (1995), 151–160.
- [3] C. Vaquette, Elaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire, Laboratoire d'Energétique et de Mécanique Théorique et Appliquée, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 2008.
- [4] A. Cipitria et al., Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review, *J. Mater. Chem.* **21**(26) (2011), 9419–9453.
- [5] H. Fong, I. Chun and D.H. Reneker, Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer* **40**(16) (1999), 4585–4592.
- [6] D.W. Huttmacher et al., Design and fabrication of a 3D scaffold for tissue engineering bone, in: *Synthetic Bioabsorbable Polymers for Implants*, C.M. Agrawal, J.E. Parr and S.T. Lin, eds, Amer. Soc. Test. Mater., West Conshohocken, PA, 2000.
- [7] V. Karageorgiou and D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* **26** (2005), 5474–5491.

Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce Bone

Sandy Eap^a, David Morand^{a,b}, François Clauss^{a,b}, Olivier Huck^{a,b}, Jean-François Stoltz^d,
Jean-Christophe Lutz^{a,c}, Nadia Benkirane-Jessel^{a,b*}, Laetitia Keller^a

^a*French National Institut of Health and Medical Research (INSERM), Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine, UMR 1109, Faculté de Médecine, 67085 Strasbourg Cedex, France*

^b*Université de Strasbourg, Faculté de chirurgie Dentaire, Strasbourg, France*

^c*Hôpital Civil, service de Chirurgie Maxillo-Faciale, Strasbourg, France*

^d*Hôpital Central, Service de Chirurgie Orthopédique and CNRS UMR 7561, Nancy, France*

Abstract. Designing unique nanostructured biomimetic materials is a new challenge in modern regenerative medicine. In order to develop functional substitutes for damaged organs or tissues, several methods have been used to create implants able to regenerate robust and durable bone. Electrospinning produces nonwoven scaffolds based on polymer nanofibers mimicking the fibrillar organization of bone extracellular matrix. Here, we describe a biomimetic 3D thick nanofibrous scaffold obtained by electrospinning of the biodegradable, bioresorbable and FDA-approved polymer, poly(ϵ -caprolactone). Such scaffold presents a thickness reaching one centimeter. We report here the demonstration that the designed nanostructured implant is able to induce *in vivo* bone regeneration.

Keywords. Bone induction, tissue engineering, 3D scaffold, polycaprolactone, electrospinning.

Introduction

Bone regeneration issues have been addressed for many years because of the aging of the population and thousands of people suffering from bone trauma or bone diseases every year[1]. Indeed, bone has a regenerating capacity however this capability is limited with the size of the trauma and/or the patient health condition. Without an ideal bone substitute and with a limited number of available donors for organ transplantation, designing new active biomaterials using living combination of cells and biochemical treatments is now a challenge in modern medicine. With this aim, new biomimetic 3D scaffolds inspired by the intricate fibrillar architecture of natural extracellular matrix (ECM) have been developed [2].

Such scaffolds have already shown remarkable achievement in the field of tissue engineering[3, 4], examples of which include reconstruction of a dog urinary

bladder[2], or regeneration after brain injury in a mouse stroke model[5]. These biomimetic scaffolds are able to provide spatial guidance to cells thanks to their 3D structure thus helping tissue regeneration and allowing restoration of structure and function of damaged tissues.

In clinical surgery, guided bone regeneration is currently carried out with Geistlich Bio-Gide® collagen membranes. This membrane enables excellent soft-tissue integration and bone regeneration based on its natural bilayer structure [6-9]. It has been shown that equipping these already used in the clinic devices with nanocontainers of active compounds allowed optimization of bone regeneration[10]. However, it has been reported that collagen membranes from animal origin could provoke inflammatory reaction[11-13] that is why a novel strategy based on a biomimetic active nanofibrous scaffold has been developed by electrospinning of poly(ϵ -caprolactone) (PCL)[14-16]. PCL is a well-known synthetic biodegradable and biocompatible polymer that has been clinically approved by FDA (US Food and Drug Administration).

In the recent years, electrospinning has been actively explored because of its process simplicity and adequate morphology of the obtained structure for tissue engineering. Electrospun scaffolds are thin (up to 1 mm thick) [17, 18] and constituted of polymer fibers with diameter varying from 100 nm up to several μ m. These nanofibers present high specific area and macroporous structure thus allowing superior cell adhesion, infiltration and proliferation. In a recent study, we reported that such nanofibrous scaffolds equipped with active nanoreservoirs could regenerate bone and even osteochondral defects [14, 15]. Additionally, electrospun thick scaffolds have been designed and developed in order to regenerate large defects caused by traumas without using bone substitutes [19].

Therefore, our strategy to develop a 3D and thick scaffold based on a FDA-approved PCL by electrospinning has shown positive results in the field of bone regeneration. The scaffold characteristics and its potential to regenerate bone *in vitro* have been previously verified [19]. We report here the capability of our designed PCL 3D thick nanofibrous scaffold to induce osteogenic properties and regenerate bone *in vivo*.

1. Material and methods

1.1. Materials

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), Capa 6800 (Mw=80000 Da.), was purchased from PERSTORP (Industriparken, Sweden). PCL was dissolved in a mixture of dichloromethane/dimethylformamide (DCM/DMF 40/60 vol/vol) at 27 % wt/vol and was stirred overnight before use to ensure good polymer solubilisation.

1.2. Electrospinning

The PCL solution was delivered at a feeding rate of 2mL/h through a needle. To collect the PCL 3D scaffold, a collector plate connected to the high-voltage power supply was placed around 16 cm from the needle tip. A poly(methyl metacrylate) (PMMA) plate 3 mm thick pierced with a hole (25 mm in diameter) was placed over the conductive collector. The PCL solution was electrospun at a high voltage of +15kV set on the needle and -5kV set on the collector at the beginning of the process to create nanofibers

then the voltage was increased regularly during the process up to 30 kV. For all the experiments, the ambient conditions were set to be around 30°C and 35% humidity. Final size of the resulting scaffolds reached 10 mm in thickness. The scaffolds presented nanofibers with a majority of fibers having diameters ranging from 100 nm to 300 nm. Their porosity of 93% and size pore over 100 μm make them adequate for tissue engineering. The produced nonwoven fabrics were kept overnight at 45°C in a desiccator to evaporate residual solvent.

1.3. Cell culture

Human primary osteoblasts (HOB) were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany) and cultured in a specific osteoblast growth medium completed with PromoCell complement and 50 U mL^{-1} penicillin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin (Life Technologies, Paisley, UK). The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured.

1.4. SEM observation

For cell morphological study, after fixation with glutaraldehyde at 2.5% in PBS for 2h at 37°C, and osmium tetroxide at 1% in PBS for 1h at room temperature, the samples were dehydrated. Then the scaffolds were gold-coated (Edwards Sputter Coater) and observed with a scanning electron microscope (SEM Hitachi TM1000) in conventional mode (high vacuum).

1.5. In vivo implantation in mice calvaria

Anesthesia was performed with an intra-peritoneal injection of a mix of Ketamine 500 and Rompun 2% in distilled water. Animals were placed on ventral decubitus on a heating table, with strict aseptic conditions. After skin incision, one bony defect was performed using an electric drill with a sterile round bur before insertion of one PCL 3D implant. The skin was closed with sutures sewed with Ethicon 9/0 and the animal's behaviour observed after waking up. The mice were sacrificed with an intra-peritoneal injection of lethal dose of pentobarbital and the samples were extracted 4 weeks post-implantation.

1.6. Immunocytochemistry staining and observation

After extraction, the *in vivo* samples were fixed with a solution at 4% PFA/PBS overnight at 4°C. Then, they were embedded in OCT Tissue Tek® and cut into sections with a cryostat. The obtained sections were permeabilized with 0.1% PBS-Triton X-100 and saturated with BSA 0.1% for 30 min. Then they were incubated for 5 min with 200 nM DAPI (Sigma) for nucleus staining. The sections were also incubated with the primary antibody osteopontin. After rinsing with PBS, cells were incubated with secondary antibody anti-goat alexa fluor 488. Finally, the stained samples were rinsed with PBS, then mounted with anti-bleaching medium and observed with a fluorescence microscope Leica DM 4000 B.

1.7. Histological analysis with Mallory staining

The samples were fixed with Bouin Hollande solution during two days. Then, they were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, cleared with LMR and embedded in paraffin wax. Sections were cut at 7 μm using a sledge microtome and mounted on glass slides. After the removal of paraffin wax, sections of the calvaria implants were stained using Mallory coloration during two days.

2. Results and discussion

In a previous work[19], we reported that a novel PCL 3D nanofibrous scaffold had been developed using the electrospinning method. Moreover, the results showed that this scaffold of nearly 10 mm thick was adequate for tissue engineering and a potential candidate for bone regeneration. We have then investigated the osteogenic properties *in vivo* of such scaffold.

First, to confirm our previous work, primary human osteoblasts were seeded onto the 3D scaffold to assess cell adhesion after 3 days (Fig. 1). SEM observation shows a relatively homogeneous cell adhesion on the scaffold surface. After 3 days, the osteoblasts clearly show a highly branched and elongated morphology, which is specific of osteogenic lineage. Moreover, the numerous filopodia produced by the osteoblast are intimately in contact with the nanofibers which means that the nanofibrous structure of the scaffold allows large cell adhesion.

To further investigate the effect of the PCL thick scaffold on bone regeneration, *in vivo* implantations have been carried out. In order to study biocompatibility, cell colonization and osseointegration, the PCL 3D scaffolds were implanted first in the calvaria of GFP (Green Fluorescent Protein) mice for 2 weeks and then analyzed with immunocytochemistry staining. GFP mice were used to monitor the host cells migration into the implanted scaffold. First, the results show an excellent osseointegration of the nanofibrous implant into the bony defect (Fig. 2A, 2B). Indeed, figure 2B shows that both the implant and host bone were joined and well integrated meaning a good biocompatibility of our implant. Moreover, figure 2D shows that the host cells migration is well-advanced after only 2 weeks post-implantation. Indeed, GFP cells (in green) from the host are spreading and migrating from the bone defect deep into the nanofibrous implant. And thanks to the staining in red (Fig. 2C), the host cells can be identified as osteoblasts from the calvaria defect as osteopontine was clearly expressed into the scaffold (Fig. 2C). Moreover, osteopontine expression into the scaffold shows that the bone regeneration process has already begun after only 2 weeks post-implantation.

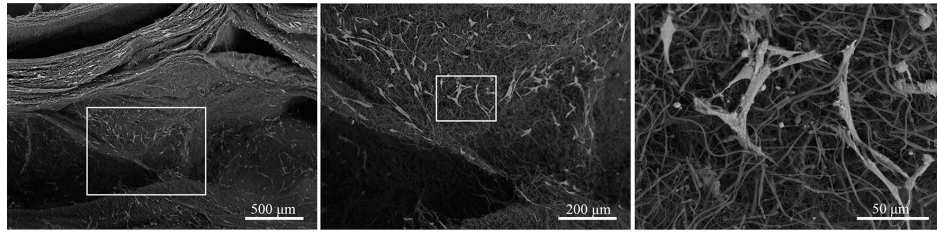


Figure 1. Scanning electron microscopy observation of osteoblasts adhesion onto the 3D nanofibrous thick scaffold after 3 days *in vitro*.

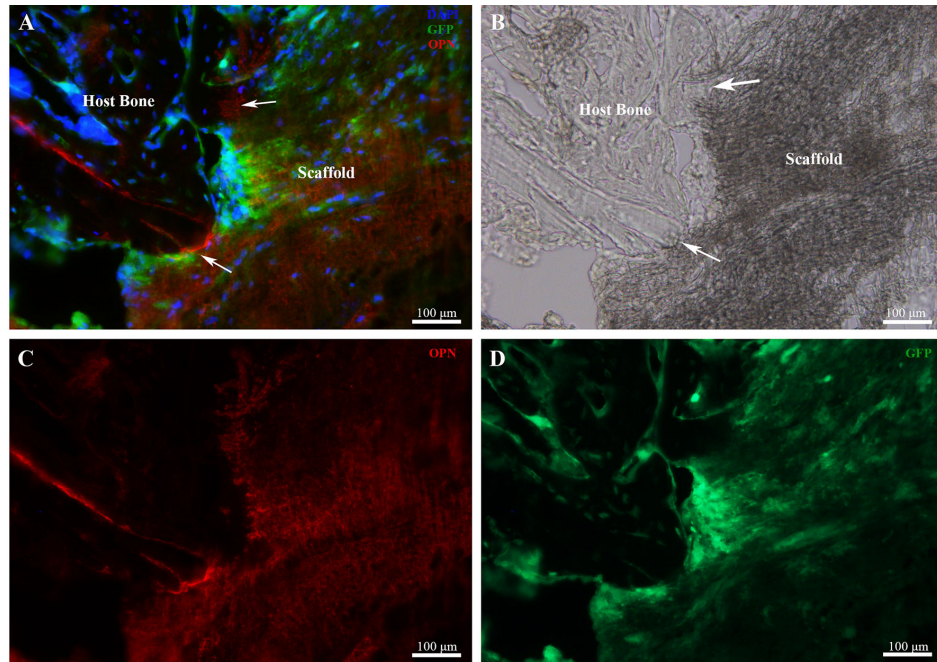


Figure 2. Fluorescent staining of the 3D thick nanofibrous implant after 2 weeks of *in vivo* implantation within a mouse calvaria. White arrows represent the osteointegration. (D) Osteoblasts migration (GFP fluorescent staining) and (C) osteopontine expression (fluorescent staining in red).

In order to confirm these results, we investigated the capabilities of our thick 3D nanofibrous implant to induce *in vivo* matrix synthesis, biomineralization and bone regeneration. Therefore, implantations have been carried out in ICR mice calvaria for 4 weeks. Mallory staining on histological sections confirmed the results above for cell colonization and osseointegration (Fig. 3). The osteoblasts followed the nanofibers direction during the colonization and neither inflammation nor macrophage could be detected. Moreover, the implant vascularization was confirmed as several blood vessels were detected. And extracellular matrix and even new biomineralized bone (Fig. 3B) were clearly identified into the nanofibrous implant, which proves the capability of our thick nanofibrous implant to induce bone regeneration. Thus, the section presented within its structure different steps of the bone regeneration process: from the beginning of bone regeneration with the osteoblast colonization into the implant through extracellular matrix synthesis, to its complete biomineralization (Fig. 3). Indeed, Figure 3B shows that the scaffold fibrous structure is still visible through the new mineralized matrix which colouring is significantly similar to the colouring of the host bone.

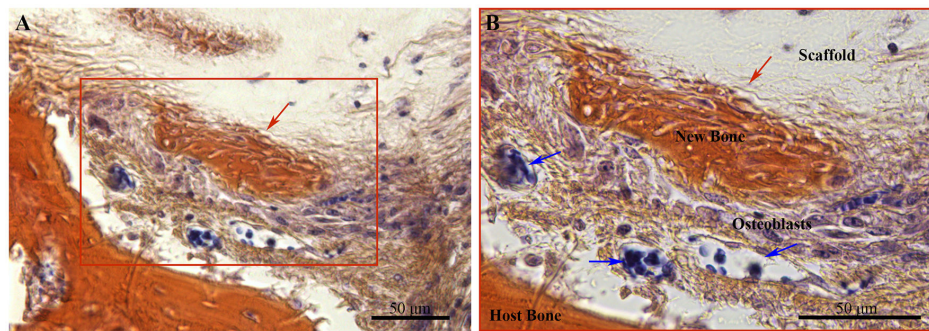


Figure 3. *In vivo* bone detection represented by red arrows after 4 weeks implantation in mouse calvaria of the 3D thick nanofibrous implant (A, B). Nanofibrous mineralized implant (new bone, red arrows) and vascularization with blood vessels (blue arrows).

In vivo implantations confirmed that our PCL thick scaffold is biocompatible and nontoxic to living organism. It was well integrated by the host, and after 4 weeks of implantation, new biomineralized area can be detected into the scaffold. However, as the sample is very thick and mouse calvaria very thin (around 500 µm thick), even with several cutting processes, our implant still largely exceeded the size defect. Therefore, another implantation model in a bigger animal must be thought in order to find a bone where the size defect would be better adapted to the sample thickness.

Conclusion

Nanostructured thick 3D PCL scaffold showed a structure mimicking the natural extracellular matrix of cells supporting and helping cell adhesion and proliferation *in vitro* and cell colonization and mineralization *in vivo*. In our previous work, *in vitro* analysis have shown interesting human primary osteoblasts proliferation and bone induction on PCL thin implant and confirmed the PCL scaffolds biocompatibility. Here, we report an excellent cell adhesion *in vitro* thanks to the thick nanofibrous PCL scaffold nature and pronounced cell colonization and differentiation, extracellular matrix synthesis and even new mineralized bone *in vivo*. Overall, the results reported show that nanostructured thick 3D PCL scaffolds can induce bone regeneration. This new scaffold aims at repairing robust and durable bone in large defects.

Acknowledgment

The authors acknowledge the support of the Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP). This work was supported by the project Neotissage from the "Agence Nationale de la Recherche, ANR". The authors thank Hervé Gégout for his nice work on histology.

References

- [1] Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R. and Petite, H., Engineering bone: challenges and obstacles, *J Cell Mol Med* **9**(2005), 72-84.
- [2] Lee, J., Cuddihy, M. J. and Kotov, N. A., Three-dimensional cell culture matrices: state of the art, *Tissue Eng Part B Rev* **14**(2008), 61-86.
- [3] Griffith, L. G. and Naughton, G., Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities, *Science* **295**(2002), 1009-1014.
- [4] Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S. and Langer, R., Nanotechnological strategies for engineering complex tissues, *Nat Nanotechnol* **6**(2010), 13-22.
- [5] Park, K. I., Teng, Y. D. and Snyder, E. Y., The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue, *Nat Biotechnol* **20**(2002), 1111-1117.
- [6] Rothamel, D., Schwarz, F., Sculean, A., Herten, M., Scherbaum, W. and Becker, J., Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells, *Clin Oral Implants Res* **15**(2004), 443-449.
- [7] Schwarz, F., Rothamel, D., Herten, M., Wustefeld, M., Sager, M., Ferrari, D. and Becker, J., Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs, *Clin Oral Implants Res* **19**(2008), 402-415.
- [8] Zitzmann, N. U., Naef, R. and Scharer, P., Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration, *Int J Oral Maxillofac Implants* **12**(1997), 844-852.
- [9] A.K. Schlegel, H. M., F. Busch, A. Mehl, Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®), *Biomaterials* **18**(1997), 535-538.
- [10] Eap S., F. A., Schiavi J., Keller L., Fioretti F., Ladam G., Benkirane-Jessel N., Collagen implants equipped by "fishscale"-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration, *Nanomedicine* 2013),
- [11] Klein B, S. R., Hafemann B, Klosterhalfen B, Zwadlo-Klarwasser G., Inflammatory response to a porcine membrane composed of fibrous collagen and elastin as dermal substitute., *J Mater Sci Mater Med*. **12**(2001), 419-429.
- [12] Richard G. Jansen, T. H. v. K., Willeke F. Daamen, Anne Marie Kuijpers-Jagtman, Johannes W. Von den Hoff, Tissue reactions to collagen scaffolds in the oral mucosa and skin of rats: Environmental and mechanical factors, *Archives of Oral Biology* **53**(2008), 376-387.
- [13] Ye Q, v. A. M., Sandham JA, Bank RA, van Luyn MJ, Harmsen MC., Site-specific tissue inhibitor of metalloproteinase-1 governs the matrix metalloproteinases-dependent degradation of crosslinked collagen scaffolds and is correlated with interleukin-10, *J Tissue Eng Regen Med*. **5**(2011), 264-274.
- [14] Mendoza-Palomares, C., Ferrand, A., Facca, S., Fioretti, F., Ladam, G., Kuchler-Bopp, S., Regnier, T., Mainard, D. and Benkirane-Jessel, N., Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics, *ACS Nano* **6**(2012), 483-490.
- [15] Ferrand A, E. S., Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, Atmani H, Mély Y, Fioretti F, Schlatter G, Kuhn L, Ladam G, Benkirane-Jessel N., Osteogenetic Properties of Electrospun Nanofibrous PCL Scaffolds Equipped With Chitosan-Based Nanoreservoirs of Growth Factors, *Macromolecular Bioscience* 2013),
- [16] Eap S, K. L., Ferrand A, Schiavi J, Lahdri D, Lemoine S, Facca S, Mainard D, Agarwal A, Benkirane-Jessel N., Nanomechanical Properties of Active Nanofibrous Implants after *in vivo* Bone Regeneration, *Nano LIFE* **4**(2014), 1450001-1450010.
- [17] Ebersole, G. C., Buettmann, E. G., MacEwan, M. R., Tang, M. E., Frisella, M. M., Matthews, B. D. and Deeken, C. R., Development of novel electrospun absorbable polycaprolactone (PCL) scaffolds for hernia repair applications, *Surgical Endoscopy* 1-12.
- [18] Ghasemi-Mobarakeh L, M. M., Karbalaie K, Fesharaki MA, Nematollahi M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H., The thickness of electrospun poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds influences cell proliferation, *Int J Artif Organs*. **32**(2009), 150-158.
- [19] Eap S, F. A., Palomares CM, Hébraud A, Stoltz JF, Mainard D, Schlatter G, Benkirane-Jessel N., Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering., *Biomedical Materials and Engineering* **22**(2012), 137-141.

Chapitre 4

Double fonctionnalisation d'implants 3D par des nanoréservoirs actifs et des cellules pour la médecine régénérative osseuse

- Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, Gauthier C, Sebastian V, Schwinté P & Benkirane-Jessel N (2014). Living Thick Nanofibrous Implant bi-functionalized with Active Growth Factor and Stem Cells for Bone Regeneration. *International Journal of Nanomedicine*. Submitted.

4.1. Contexte et objectifs

Les nouvelles générations de biomatériaux se focalisent vers une régénération osseuse plus rapide et durable afin de réduire les temps de guérison et de minimiser les risques de complications postopératoires chez les patients. En effet, dans certaines situations la régénération d'un très grand volume osseux est requise ; elle est souvent due à la nécessité de reconstruction osseuse ayant pour origine des traumatismes, des résections tumorales, ou lors de réparations osseuses compromises (ostéoporose, pseudarthroses). Les greffes osseuses autologues lors du traitement clinique de telles situations sont cependant limitées.

L'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative osseuse sont des stratégies pleines de promesses et d'avenir. En effet, grâce au développement de nouvelles technologies, il est aujourd'hui possible de développer non plus des implants inertes mais plutôt des implants fonctionnels et vivants pouvant aider à la régénération du tissu lésé (Salgado et al., 2004 ; Dvir et al., 2011). Ces implants pourraient pallier les limites des thérapeutiques actuelles en combinant le savoir-faire de la chirurgie orthopédique et les technologies développées par la science dans le domaine des biomatériaux et de la biologie appliquée à la santé. Aujourd'hui, en clinique des cellules progénitrices telles que les cellules mésenchymateuses (CSMs) ou des cellules matures (ostéoblastes) provenant du patient sont utilisées en combinaison de biomatériaux (Chatterjea et al., 2010; Kumar et al., 2011). Des implants biocompatibles possédant une structure tridimensionnelle biomimétique proche du tissu vivant et fonctionnalisés par des facteurs de croissance combinés aux cellules vivantes pourraient ainsi former un complexe vivant et fonctionnel pouvant aider et accélérer la régénération osseuse de façon sûre et durable.

Nous présentons ici les implants nanofibreux 3D développés précédemment et rendus bioactifs grâce aux nanoréservoirs incorporant le facteur de croissance BMP-7 (approuvé par la FDA). Le polycation choisi pour la construction des nanoréservoirs est le chitosane. Ce polysaccharide approuvé par la FDA a prouvé ses propriétés ostéogéniques dans les études précédentes (**Chapitre 1 et 2**). De plus, des cellules primaires autologues spécifiques du patient mais aussi des cellules souches dérivées de la moelle osseuse de donneurs ont été utilisées en combinaison avec les implants biomimétiques et actifs dans le but d'accélérer la régénération de grandes lésions osseuses.

4.2. Résultats et discussion

4.2.1. Effet de la double fonctionnalisation des implants 3D sur la régénération osseuse

La construction des nanoréservoirs ainsi que leur morphologie ont été confirmées au MEB. Les nanofibres de l'implant sont recouvertes de nanoréservoirs de morphologie écaillée due à l'utilisation du chitosane en tant que polycation pour la construction des nanoréservoirs. L'adhésion et la morphologie cellulaire des ostéoblastes humains primaires sur l'implant fonctionnalisé ont été comparées au MEB à celles de ces mêmes cellules sur l'implant non fonctionnalisé. Les cellules adhèrent en cluster au contact des nanoréservoirs au contraire des cellules adhérentes aux implants non fonctionnalisés. Cette différence de comportement s'estompe par la suite. En effet, la morphologie cellulaire devient similaire sur les deux types d'implants et le suivi de la prolifération cellulaire ne montre aucune différence significative entre implants fonctionnalisés et non fonctionnalisés. De plus, l'effet ostéoinducteur des nanoréservoirs de BMP-7 sur les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) a été démontré *in vitro* par immuno-marquage.

Par ailleurs, des implantations en calvaria chez le modèle murin ont été réalisées. Les résultats *in vivo* montrent qu'après 4 semaines, les implants 3D bioactifs accélèrent le processus de régénération osseuse. En effet, les analyses histologiques montrent les effets ostéoconducteurs des nanoréservoirs de BMP-7 dès l'étape de colonisation cellulaire qui est déjà plus avancée au sein de l'implant fonctionnalisé en comparaison de l'implant non fonctionnalisé. De plus, les analyses montrent une estimation de la minéralisation à seulement 18 % de l'implant non fonctionnalisé contre 31 % pour l'implant bioactif au même stade d'implantation. Des analyses au microscope électronique à balayage couplé à une spectroscopie aux rayons X à dispersion d'énergie (SEM-EDS X-ray spectroscopy en anglais) ont été également réalisées. Elles montrent clairement une colocalisation des signaux de calcium et de phosphate signifiant la minéralisation effective des implants. Le module d'élasticité (E) des implants fonctionnalisés et non fonctionnalisés a été mesuré par nanoindentation. Les résultats prouvent que le module d'élasticité des implants bioactifs est supérieur à celui des implants inertes. Nous avons ainsi démontré que l'implant rendu bioactif

grâce aux nanoréservoirs de BMP-7 présente la capacité à recruter les cellules au niveau du site osseux lésé et à accélérer la régénération osseuse.

D'autre part, des CSMs dérivées de la moelle osseuse ont été combinées aux implants afin d'augmenter leur potentiel ostéoinducteur les rendant ainsi bioactifs et vivants. Des implantations en calvaria chez le modèle murin ont été réalisées avec l'ajout de CSMs sur les implants bioactifs et inertes. Les analyses au SEM-EDS ont permis de confirmer la minéralisation effective de ces implants. De plus, après injection intra-péritonéale de calcéine et analyse au microscope à fluorescence, nous avons démontré que l'ajout de cellules souches permettait une accélération de la minéralisation osseuse *in vivo* agissant en synergie avec les nanoréservoirs actifs de BMP-7.

Cette stratégie de double fonctionnalisation, par incorporation non seulement de cellules souches mais aussi de facteurs de croissance, pourrait également pallier certains problèmes liés au vieillissement cellulaire du donneur. En effet, le problème du vieillissement des cellules souches se pose lorsque le patient traité a atteint un certain âge. Les capacités des CSMs à proliférer et leurs propriétés à se différencier et à régénérer différents tissus et organes sont altérées avec le temps entraînant une réparation tissulaire inefficace (Silva and Conboy, 2008 ; Li et al., 2014b). Contrairement aux cellules souches embryonnaires provenant directement de l'embryon humain et possédant une propriété d'auto-renouvellement, les CSMs de patients adultes présentent une capacité de prolifération diminuant avec l'âge (Li et al., 2014b). De plus, une altération de certaines voies de signalisation liées aux capacités régénératives des cellules souches pourrait être la cause des effets âge-dépendants négatifs sur ces cellules (Molofsky et al., 2006). Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires régissant le vieillissement des cellules souches sont encore méconnus et sont le sujet de nombreuses recherches. En revanche, le problème du vieillissement cellulaire ne se pose pas pour les patients plus jeunes. Toutefois, en tenant compte des prévisions démographiques et du vieillissement croissant de la population, il est à prévoir que l'âge moyen de prise en charge et de traitement pour des traumatismes liés à des pathologies telles que l'ostéoporose ne fera qu'augmenter. L'utilisation des CSMs chez ces patients ne suffira peut être plus à pallier le manque osseux causé par des dommages irréversibles. C'est pourquoi l'utilisation d'implants 3D fonctionnalisés de nanoréservoirs actifs combinés aux CSMs pourrait aider leur prolifération et leur différenciation cellulaire chez les patients d'un certain âge.

4.2.2. Les sources alternatives de cellules souches

Les CSMs utilisées dans notre étude sont dérivées de la moelle osseuse, il en est de même concernant les CSMs autorisées et utilisées en clinique (Sensebe et al., 2011). Les CSMs dérivées de la moelle osseuse sont les plus connues et les mieux caractérisées au niveau biologique. C'est pourquoi elles ont été les premières à être utilisées en clinique. Cependant, les limites quant à leur utilisation ont été mises en évidence depuis plusieurs années. En effet, ces cellules sont prélevées directement chez le patient exigeant une intervention chirurgicale douloureuse et invasive pour le patient. De plus, le problème âge-dépendant mentionné précédemment provoque une diminution des capacités de prolifération et de différenciation de ces CSMs (Bajek et al., 2012). C'est pourquoi les chercheurs se sont tournés vers d'autres sources possibles de CSMs telles que les CSMs provenant de la gelée de Wharton (Wang et al., 2004 ; Margossian et al., 2012), du tissu adipeux (Lim et al., 2014), ou encore du fluide amniotique (Zhou et al., 2014). Les principales caractéristiques de ces CSMs de sources différentes sont toutes présentes : leur morphologie, leur capacité d'adhésion et de prolifération, leurs marqueurs de surface spécifiques aux CSMs, et leur capacité de différenciation ont été testés et comparés (Kern et al., 2006; Li et al., 2014a). Il en résulte que les CSMs provenant de la gelée de Wharton ont montré la meilleure capacité de prolifération et de différenciation ostéogénique ainsi que le plus fort potentiel immunomodulateur et immunosuppresseur au niveau moléculaire. Ces CSMs pourraient donc être une des meilleures sources cellulaires possibles pour une future application de régénération tissulaire en clinique (Li et al., 2014a).

Les CSMs provenant du tissu adipeux et du fluide amniotique présentent également les propriétés caractéristiques des CSMs (Wagner et al., 2005; Zhou et al., 2014). Elles ont d'ailleurs fait l'objet de recherches poussées depuis ces dernières années en vue d'une application clinique potentielle (Zuk, 2010 ; Turner et al., 2011). D'une part, l'extraction des cellules souches provenant du tissu adipeux nécessite tout de même une intervention chirurgicale mais certes moins lourde que celle nécessaire à l'extraction des cellules dérivées de la moelle osseuse. D'autre part, la source alternative de CSMs autre que la moelle osseuse la plus proche d'être utilisée en clinique est le liquide amniotique. Des études précliniques en vue d'obtenir des autorisations cliniques ont utilisé des CSMs du liquide amniotique pour régénérer différents tissus incluant des greffes de cartilage pour une reconstruction trachéale,

ou encore des greffes de diaphragme pour une application chez des nouveaux nés (Steigman et al., 2008; Turner et al., 2011 ; Gray et al., 2012). Il serait très intéressant de comparer et peut-être même d'améliorer la régénération osseuse en utilisant nos implants nanofibreux actifsensemencés de cellules souches provenant d'origines différentes telles que les CSMs de la gélée de Wharton ou du tissu adipeux.

Malgré les nombreuses sources possibles des CSMs, leur utilisation reste tout de même restreinte à une utilisation autologue (Sensebe et al., 2011). En effet, bien que les CSMs soient connues pour leur potentiel immunomodulateur et immunosuppresseur, les risques quant à l'utilisation de CSMs de source allogénique restent présents lors de leurs implantations. Des problèmes immunogéniques liés à une utilisation de CSMs de source allogénique ont été montrés chez des souris non immunodéprimées (Eliopoulos et al., 2005; Nauta et al., 2006; Zhou et al., 2014). Une étude a notamment mis en évidence que l'injection de CSMs allogéniques au sein de souris non immunodéprimées suffisait à induire une réponse de la mémoire immunitaire des cellules T pouvant provoquer le rejet de la greffe allogénique (Nauta et al., 2006). Les mécanismes d'immunomodulation des CSMs doivent encore être explorés afin de pouvoir espérer un jour utiliser ces cellules de façon universelle et sécurisée. En effet, l'existence de banques de cellules souches universelles permettrait un accès à une quantité quasi-illimitée de matériel biologique, de pallier le problème du vieillissement cellulaire, et éliminerait également les problèmes liés à la chirurgie nécessaire à l'extraction des CSMs autologues.

4.3. Conclusion

L'implantation en clinique de biomatériaux vivants et nanostructurés grâce à l'utilisation combinée de molécules actives et de cellules souches pourrait écourter les temps de guérison mais également réduire les risques d'infections ou de complications postopératoires. Ces technologies innovantes pourraient améliorer la qualité des soins, réduire la douleur, réduire les coûts et engendrer un impact économique favorable dans notre système de santé.

Notre implant 3D biomimétique, bioactif et vivant a montré sa capacité à induire une régénération osseuse plus rapide et plus importante. Ces résultats plus qu'encourageants nous conduisent à proposer un nouveau dispositif médical combinant facteurs de croissance et cellules vivantes agissant en synergie et pouvant améliorer les performances de notre implant nanofibreux. Cette double fonctionnalisation pourrait ainsi conduire au développement d'une nouvelle génération d'implants osseux actifs et vivants « les implants intelligents ».

Living Thick Nanofibrous Implant bi-functionalized with Active Growth Factor and Stem Cells for Bone Regeneration.

Sandy Eap^{a, b, 1}, Laetitia Keller^{a, b, d, 1}, Jessica Schiavi^{a, b}, Olivier Huck^{a, b}, Leandro Jacomine^c, Florence Fioretti^{a, b}, Christian Gauthier^c, Victor Sebastian^{a, d, e}, Pascale Schwinté^{a, b} and Nadia Benkirane-Jessel^{a, b, *}

^aINSERM, UMR 1109, "Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine" laboratory, <http://www.regmed.fr>, FMTS, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg Cedex; ^bUniversité de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg ; ^cCNRS, ICS, 23 rue du Loess, Strasbourg, France ; ^dDepartment of Chemical Engineering and Aragon Nanoscience Institute, University of Zaragoza, C/Mariano Esquillor, s/n, 50018, Zaragoza, Spain; ^eNetworking Research Center Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, (Ciber-BBN) 50018 Zaragoza, Spain.

Author Contributions: ¹ These authors have equally contributed to this work.

Correspondence^{*} : Nadia Benkirane-Jessel

UMR 1109, INSERM / Université de Strasbourg

FACULTE DE MEDECINE, 11 RUE HUMANN

67085, STRASBOURG, FRANCE

Phone (33)-3-68-85-33-76

<http://www.regmed.fr/>

Tel (33)-3-68-85-33-76

Email nadia.jessel@inserm.fr

Abstract: New generation of implants focus on robust, durable and rapid tissue regeneration to shorten recovery times and decrease risks of postoperative complications for patients. Here, we describe a new generation of thick nanofibrous implant functionalized with active containers of growth factors and stem cells for regenerative nanomedicine. A thick electrospun polycaprolactone (PCL) nanofibrous implant (from 700 μm to 1cm thick) was functionalized with Bone Morphogenetic Protein BMP-7 as growth factor using the layer-by-layer (LBL) technology, producing fishscale-like chitosan-BMP-7 nanoreservoirs. This ExtraCellular Matrix (ECM) mimicking scaffold enabled *in vitro* colonization and bone regeneration by human primary osteoblasts, as shown by expression of osteocalcin, osteopontin and bone sialoprotein (BSP), 21 days after seeding. *In vivo* implantation in mice calvaria defects showed significantly more newly mineralized ECM in the functionalized implant compared to a bare scaffold after 30 days implantation, as shown by histological, SEM-EDS X-ray study and calcein injection. We have as well bi-functionalised our BMP-7 therapeutic implant by adding human mesenchymal stem cells (hMSCs). The activity of this BMP-7 functionalized implant was again further enhanced by the addition of hMSCs to the implant (living materials), *in vivo*, as demonstrated by the analysis of new bone formation and calcification after 30 days implantation in mice calvaria defects. Therefore, implant functionalized with BMP-7 nanocontainers associated with hMSCs can act as an accelerator of the *in vivo* bone mineralization and regeneration.

Keywords: regenerative nanomedicine, bone regeneration, electrospun nanofibers implant, nanocontainers of growth factors, BMP-7, stem cells

Introduction

Bone regeneration is a complex, well-orchestrated physiological process of bone formation, which can be seen during normal fracture healing, and is involved in continuous remodelling throughout adult life. Nevertheless, there are difficult clinical situations in which bone regeneration is required in large quantity, such as for skeletal reconstruction of large bone defects created by trauma, tumour resection, or cases in which the regenerative process is compromised (non-unions, osteoporosis). The common bone-regeneration techniques used today include the implantation of free fibula vascularised grafts, autologous bone grafts, allograft

implantations, and use of growth factors, scaffolds and osteoprogenitor cells, but all of those are limited.¹ The tissue-engineering approach is a promising strategy in the field of bone regenerative medicine, which aims to generate new functional tissues, rather than just to implant non-living scaffolds.² This alternative could overcome the limitations of current therapies, by combining the knowledge in orthopaedic surgery together with materials science and biology, and its clinical application offers great potential ^{2,3,4}. For example, distraction osteogenesis and bone transport requiring long treatment possibly have an effect on patient's psychology. Bone grafting requires additional surgical procedure, leading to discomfort for the patient and is limited by the availability of bone. Bone-graft substitutes like metals exhibits poor integration and β -TCP or ceramics are brittle ^{2,3,4}. For these reasons, bone tissue-engineering materials supplied with cells represent the alternative solution for efficient and robust bone repair ^{2,3,4}. Basically, bone-tissue engineering combines progenitor cells, such as mesenchymal stem cells (MSCs) (native or expanded) or mature cells (osteoblasts) seeded in biocompatible scaffolds and ideally in three-dimensional tissue-like structures with appropriate growth factors like bone morphogenic proteins (BMPs) in order to generate and maintain bone natural regeneration.⁵

To date, three polymer processing technologies (self-assembly, phase separation, electrospinning) allow the fabrication of nanofibrous scaffolds.⁶⁻⁹ Our strategy for regenerating bone combines a synthetic electrospun nanofibrous membrane (ENM) composed of the FDA-approved poly(ϵ -caprolactone) (PCL) polymer, and the bioactive growth factor BMP-2 entrapped into polymer nanoreservoirs (NR) built atop the nanofibers according to the Layer-by-Layer technology and fortified.¹⁰⁻²¹

In bone repair, for a small lesion, we do not need bone substitute, as at this early stage the regenerative medicine is suitable to regenerate bone tissue. In regenerative medicine, the European and American authorities have already approved the use of BMP-2 or BMP-7 for bone regeneration applications. For example, Medtronic offers InductOS® which is a basic collagen matrix (of animal origin) soaked in BMP-2 (12 mg) and Stryker offers the same collagen membrane soaked in BMP-7. The efficacy of this kind of combination device is dependent on slow release kinetics of BMPs. This criterion is recognized as the critical, most challenging requirement for combination implants. For efficient bone regeneration, the target

cells require a reliable and continuous exposure to growth factors over an extended period of time, until the induction of new bone. The currently available devices are totally unsophisticated in this respect. In contrast, our innovative medical device, with cell contact-dependent delivery from nanoreservoirs, is designed specifically for reliable and sustained availability of BMP-2.^{16,21,22} This strategy aims at a dramatic enhancement of therapeutic efficacy at reduced cost.

Recently we have reported the capability of a thin (50 μm thick) electrospun nanofibrous PCL membrane functionalised with nanoreservoirs of BMP-2 to increase the speed of bone regeneration both *in vitro* and *in vivo*.²¹ The aim of the present study was to use the same PCL polymer to electrospun a thick nanofibrous membrane (from 700 μm to 1 cm) for large lesions.

In this study, we have chosen BMP-7 as growth factor to functionalize the thick PCL membrane. This is the first investigation of combined biodegradable thick PCL membrane and active molecules for regenerative medicine. We have as well fortified this membrane by adding human mesenchymal stem cells (hMSCs). This hybrid and living implant was then analysed in term of bone induction and the capability to increase the speed of bone regeneration.

In regenerative medicine, the need for such improved composite grafts is obvious, especially for the management of large bone defects (1-2 cm diameter, 2-4 mm thickness), for which the requirements for grafting material are substantial.

Today, composite grafts that are available include synthetic bone or bioabsorbable scaffolds seeded with bone-marrow aspirate or growth factors like BMPs, providing a competitive alternative to autologous bone grafts.²³ We report here a new thick nanofibrous electrospun polycaprolactone implant (700 μm thick) functionalized with low-dose bioactive nanocontainers of BMP-7 and seeded with hMSCs as a new strategy to regenerate robust tissue in large size bone defects.

Recently, great progress has been made in a new generation of biomaterials based on nanotechnology. Nanofibrous biomaterials play central roles in modern strategies in regenerative nanomedicine. The guidance provided by these biomaterials could facilitate restoration of structure and function in damaged or dysfunctional tissues. Such materials should provide provisional 3D support to interact with cells in ways that control their function, by spatially and temporally guiding the complex cellular processes of tissue formation and regeneration.²⁴⁻³¹ Synthetic bone regenerative scaffolds have been used or investigated over

the last century. Several bio-mimicking medical devices for regenerative medicine have been inspired from the intricate fibrillar architecture of the natural extracellular matrix (ECM).³² Such matrices have already shown remarkable success in tissue engineering applications, examples of which include the reconstruction of a dog urinary bladder, or the regeneration after brain injury in a mouse stroke model.^{27, 33, 34} However, it is established that inert ECM mimetic scaffolds are not efficient to generate durable tissue repair.^{27, 32, 33} Therefore, there is a need for materials ensuring the sustained release of active compounds. To this end, recent advances in nanotechnology have led to various engineered ECM analogues (electrospun nanofibers) and biomaterials functionalized with active therapeutics (drugs, genes or growth factors).^{13, 15, 16, 19, 21, 35-42}

Polymer processing technologies such as electrospinning⁴³ allow nanofibers formation down to the 10 nm scale. Recently, we have reported that it is possible to incorporate active growth factors (BMP-2, TGF- β 1) as nanoreservoirs to induce bone formation.^{20, 21, 44-46} We have also shown that electrospun thin PCL (Poly (ϵ -caprolactone)) membranes (50 μ m) increase the speed of bone regeneration when they incorporate BMP-2 within nanocontainers. We have also shown no passive uncontrolled release of those growth factors from the active nanocontainers, but an active cell-contact dependent release.²¹ In this study, we have used the polymer PCL to manufacture thick electrospun nanofibers as scaffolds.

Electrospun nanofibers have extremely high specific surface area to volume ratio because of their small diameters, and the resulting 3D thick nanofiber implants are highly porous with excellent pore interconnectivity. These unique characteristics reveal nanofiber-based implants with many desirable properties for advanced applications.

Recently different groups have developed different strategies by using not only PCL and mesenchymal stem cells but also BMPs to induce bone regeneration. Our strategy combines both active nanoreservoirs of BMPs (cell contact dependent release) and stem cells as a new strategy to increase the speed of bone regeneration. Previously, we have used BMPs and primary cells. Concerning the electrospun PCL nanofibrous scaffold, in our previous studies, we have used a thin membrane (50 μ m), in this study, we have used a thick membrane. This system combined thick synthetic electrospun nanofibrous membranes (ENM) of the FDA-approved PCL polymer, and the bioactive growth factor BMP-7 (bone morphogenetic protein 7)

confined atop the nanofibers according to the Layer-by-Layer (LbL) technology.¹² The latter consisted in a repeated sequence of simple alternate immersions of the ENM scaffold into (i) a solution of chitosan (CHI), a biocompatible polysaccharide with bone regenerative properties^{20, 43} and (ii) a solution of BMP-7 (with rinsing steps between consecutive adsorption steps).

We studied the LbL build-up of the BMP-7-based architectures by means of quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D), and inspected the structure of the electrospun nanofibers scaffolds with scanning electron microscopy (SEM). The potency of the BMP-7-loaded nanofibrous scaffolds with regards to bone regeneration was assessed both *in vitro* and *in vivo* by inspecting cell adhesion, proliferation and specific gene expression, and bone regeneration after implantation in mice.

Material and methods

3D nanofibrous PCL scaffold preparation and BMP-7 nanoreservoirs build-up

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), analytical grade, was obtained from Perstorp (Sweden). A solution of PCL (23% wt/v, in dimethylformamide:methylene chloride 1:1 v/v) was electrospun at high voltage (20 kV at the beginning) which was increased during the process (26 kV at the end). During the electrospinning process (EC-DIG electrospinning apparatus, from IME Technologies, Eindhoven, Netherlands), the delivery of the PCL solution was controlled at a constant rate of 1.2 ml h⁻¹, in an atmosphere at 35 % of humidity at 30°C. The distance between the needle and the collector was set at 16 cm. The electrospun jet was focused by the use of a poly(methyl methacrylate) (PMMA) 2.5 mm thick mask drilled with a hole (diameter of 25 mm) placed over the conductive collector. The 3D electrospun nanofibers were then kept overnight in a desiccator at 45 °C to evaporate all residual solvent. For the build-up of the BMP-7 nanoreservoirs, the LbL technique was used. The PCL electrospun scaffold was dipped 4 times during 15 min in alternate solutions of Chitosan (Protasan UP CL 113, Novamatrix Norway, 500 mg mL⁻¹) and BMP-7 (Euromedex France, 200 ng mL⁻¹) in MES buffer (2-N-morpholino ethane sulfonic acid, Sigma Aldrich France, 0.04 M, NaCl 0.15M) at pH 5.5. Each bath was followed by a rinsing step in a solution of MES buffer (0.04 M, NaCl 0.15M).

Cell culture

Human primary osteoblasts and human bone marrow MSCs were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany). Osteoblasts were cultured in a specific osteoblast growth medium (Promocell) containing Supplement Mix (Promocell) and 50 U mL⁻¹ penicillin/ 50 µg mL⁻¹ streptomycin (Ozyme, France). The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin (Ozyme, France) and sub-cultured. Human MSCs were cultured with mesenchymal stem cell growth medium (Promocell) containing mesenchymal stem cell supplement mix (Promocell), 50 U mL⁻¹ penicillin and 50 µg mL⁻¹ streptomycin. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured.

Cell viability and proliferation

Cell viability was checked with Trypan Blue exclusion test. AlamarBlue® (Fischer Scientific France) was used to assess cell proliferation over time. The Alamar Blue® test is a non-toxic, water-soluble, colorimetric redox indicator that changes colour in response to cell metabolism. In this study, 4×10⁴ human osteoblasts and 3×10³ hMSCs were seeded on top of the PCL scaffolds placed on 48-well plates. After 3, 7 and 21 days of culture, cells were incubated in 10% Alamar Blue®/DMEM (medium without phenol red, Lonza) solution in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. After 4 h, 200 µL of incubation media were transferred to 96-well plates and measured at 590 nm and 630 nm in order to determine the percentage of Alamar Blue® reduction. Statistical analyses were obtained by the Two Way ANOVA test in Excel.

In vivo implantation on skull of nude mice

Animals and tissues: All procedures were designed in compliance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals.

Ethics statement: Experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator Dr. N. Jessel (Director of the «Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine» Team), holder of a personal license from «Préfecture du Bas-Rhin» (No. 67-315), who oversaw experiments done on mice. All experiments were done in the "Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de

Strasbourg” with the approval number: A 67-482-35 from the Veterinary Public Health Service of the “Préfecture du Bas-Rhin”, representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science.

For further tissues implantations, all surgery was performed under ketamin and xylazin anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

The study was run with Nude male mice (CrI: NIH-Foxn1^{nu}, Charles River, France) 6 weeks of age. The mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection of 100 mg kg⁻¹ of ketamin (VIRBAC Santé Animale, Centravet) and 10 mg kg⁻¹ of xylazin (Rompun® 2%, Centravet) and animals were placed on ventral decubitus on a heating table, with strict aseptic conditions. After skin incision, two bony defects (2 mm size) were performed in the parietal zone of the skull using an electric drill with a sterile round bur under irrigation of sterile normal saline before deposition of two samples of nanofibrous PCL implant (either not functionalized or functionalized with nanocontainers of BMP-7 and/or hMSCs) and sutured with Ethicon 9/0. hMSCs were seeded on the implant 2 h before implantation. The skin was sealed with sutures and the animal's behaviour observed after waking up. The mice were sacrificed with an intra-peritoneal injection of lethal dose of ketamin and the samples were extracted after 30 days of implantation.

Histology

For histology, samples (the implants) were fixed for 24 h in Bouin-Hollande and embedded in paraffin. Serial sections (7 µm) were stained with Mallory's stain. After long-term implantations, the samples were demineralized in 15% EDTA for 48 h. After the removal of paraffin wax, sections of the calvaria implants were stained using Mallory coloration during two days. The percentage of mineralized area on histological sections was measured with the Image J software by selecting mineralized area and total implant area.

Scanning electron microscopy

To analyse the morphology, the scaffolds were gold-coated (Edwards Sputter Coater) after fixation in 2.5% glutaraldehyde for 2 h at 37 °C, osmium tetroxide 1% incubation for 1 h, dehydration, and observed with a scanning electron microscope (SEM Hitachi TM1000) in conventional mode (high vacuum).

Immunofluorescence staining

Samples seeded with human osteoblasts or hMSCs were cultivated for 21 days. Then, they were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 h and incubated for 30 min with Alexa Fluor 546–conjugated phalloidin (Molecular Probes) for F-actin labelling and 5 min with 200 nM DAPI (Sigma, France) for nuclear staining. Bone growth induction was measured by assaying expression of osteopontin, osteocalcin and BSPII, using polyclonal goat anti-osteopontin (1/200; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal goat anti-osteocalcin (1/200; Santa Cruz Biotechnology) and monoclonal mouse anti-BSPII (1/200; Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. After washing with polyphosphate buffer (PBS, Sigma, France), the samples were incubated with secondary anti-goat or anti-mouse antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen). The samples were observed under an epifluorescence microscope (LEICA DM 4000 B).

Calcein injection

Subcutaneous injections of calcein (10 mg kg^{-1} , Sigma) in PBS were given on the tenth and third days before necropsy. After 30 days of calvaria implantation, mice were sacrificed, and the samples were extracted. The samples were then embedded in Tissue-Tek® OCT, frozen at -20°C and cut in sections with a cryostat (Leica JUNG CM3000). Cell nuclei were stained with 200 nM DAPI (Sigma) for 5 min. The sections were mounted with anti-fading medium and observed under an epifluorescence microscope (LEICA DM 4000 B).

SEM-EDS X-ray spectroscopy

The different implants were morphologically and compositionally analysed using a field emission SEM (Inspect™ F50; FEI, USA) equipped with an Energy-dispersive X-ray spectrometer (EDS) to map the elemental composition of the samples during the inspection. The surfaces were Pt sputtered before observation and examined at an accelerating voltage of 10 kV and a working distance of 10 mm. The fiber diameter was measured with Image J software.⁴⁷

Nanoindentation

A Berkovich indenter was used in this study. Nanoindentation cycles are divided currently in three steps: loading, creep and unloading. In these tests, a linear loading step was carried out to achieve the maximum load per cycle. Within the end of loading, the creep step is proceeding. This step is characterized by leaving the applied load constant during a certain time. The last

step is the unloading during which the mechanical properties are measured. The method used to characterize these tests is the Oliver and Pharr method.⁴⁸ The maximum load was distributed from 5 mN to 60 mN (quadratic growth). The loading and unloading time was equal to 30 s and the creep time was 50 s. At least 10 cycles of indentation test were performed at the same area, by increasing the load, to access the changes of mechanical properties in function of the indentation depth. The time between each indentation cycle carried out at the same place was 5 s.

Statistical analysis

Average and standard deviations were calculated from three repeats on each sample, except for Alamar Blue® quantification data, where duplicate readings were performed for each repeat. Error bars on graphs represent standard deviation (SD). A two-way ANOVA test was performed in Excel.

Results

BMP-7 nanoreservoirs construction for osteogenic differentiation

First, a thick electrospun PCL nanofibrous implant (700 μm thick; fibers 689 ± 45 nm in diameter) was manufactured as scaffold material to generate the tissue engineered implant (Figure 1). The effective deposition, and nanoscale dimensions, of LbL architectures onto the thick electrospun nanofibrous scaffold were confirmed by means of scanning electron microscopy (SEM) (Figure 2). While the bare nanofibers (NF, for not functionalized) displayed a smooth topography, (CHI/BMP-7)₄-treated nanofibers (called NR4) showed uniformly distributed nanostructured deposits on their surfaces. Chitosan (CHI)-based deposits had a fish scale-like morphology.

In vitro colonization and osteogenic expression induced by BMP-7 nanoreservoirs

Before investigating the behaviour of the hMSCs, we analysed the human primary osteoblasts colonization onto the PCL thick scaffold and their morphology after 3, 7 and 14 days onto this

nanofibrous scaffold with or without functionalization with the morphogenetic protein BMP-7 (Figure 3).

To investigate the behaviour of human primary osteoblasts in contact with the nanofibrous thick scaffold and the BMP-7 effect, we analysed the progress of adhesion and colonization of these cells over time. First, the Alamar Blue® reduction percentage, followed over time at 3, 7 and 14 days (Figure 3A), confirmed the viability of the cells on both types of scaffolds (without (NF) or functionalized with BMP-7 (NR4)), however the results do not significantly reveal any enhanced effect of the functionalization ($p > 0.05$ at each time and between days 7 and days 14). SEM micrographs (Figure 3B) indicate that, already after 3 days, cell adhesion was different for the functionalized scaffold (NR4) and the non-functionalized one (NF). After 3 days, the osteoblasts adhered onto the NR4 scaffold in clusters whereas onto NF scaffold cells were just individually in contact with the nanofibers. However, from day 7 until day 14, cell colonization became similar for both scaffolds, resulting in larger, far more spread and elongated cells anchored to the nanofibers through numerous filopodia extensions which represent a typical morphology for this kind of cells. To further investigate the extent of bone regeneration, the expression of osteocalcin, osteopontin and BSP II was examined 21 days after seeding (Figure 4). The immunofluorescence images show that osteogenesis occurs successfully in both types of scaffolds (NF and NR4), however the enhancement of protein expression by the functionalization is significant *in vitro*, even after 21 days.

BMP-7 nanoreservoirs can accelerate in vivo bone regeneration and mineralization

To further study matrix synthesis and bone induction, implantations were carried out *in vivo* in mice. NF and NR4 nanofibrous PCL thick scaffolds were implanted into mice calvaria defects for 15 or 30 days. At these dates, mice were sacrificed and histological study was then carried out to analyse the host cell colonization within the implants in the bone defect site, the osteointegration of the implant, the matrix synthesis and the new bone mineralization. Mallory coloration was used in order to identify mineralized bone, extracellular matrix and cell nuclei. A difference between NF and NR4 implants could be already seen at the stage of colonization and migration of osteoblasts from the site of implantation within the implants after 15 days of implantation (data not shown). After those days, the host osteoblasts have just begun to migrate

inside the NF implant whereas the colonization within the NR4 implant was clearly higher. Additionally, it appeared that the osteoblasts during migration followed the nanofibers direction and no inflammatory reaction was detected. There was even an area showing newly mineralized extracellular matrix, clearly identified (orange staining similar to the native host bone). After 30 days (Figure 5), there was significantly more newly mineralized area within NR4 compared to NF implant. In order to evaluate the amount of bio-mineralized matrix into the different implants after 30 days, quantitative measurements were made showing that only 18% of the area of the NF implant was mineralized whereas a 31% for the NR4 implant was achieved.

To further investigate these results, SEM-EDS X-ray analysis was used to monitor calcification over time in the *in vivo* model. The SEM-EDS X-ray maps of the implanted scaffolds (Figure 6) showed a clear co-localization of the calcium (Ca) and phosphorous (P) signals, indicative of bone formation. To determine the degree of conversion into natural bone 30 days after implantation, the Ca/P weight ratios were calculated. The NF and NR4 scaffolds showed ratios of 1.10 and 1.75, respectively (Figure 6A). These results were confirmed by calcein injection after 30 days of culture showing more pronounced mineralization and calcic bone area in the middle part of the NR4 implant (Figure 6B). These results indicate clearly here that by using the thick PCL membrane, after 30 days implantation in the skull of mice, we do not have a complete regeneration on the bone defect (Figure 6). That means, by using a thick graft, the functionalization with BMPs only is not sufficient to accelerate enough the speed of bone regeneration.

To better understand these results, we have analysed the elastic modulus of our retrieved implants (NF and NR4) after 30 days of implantation in mice calvaria (Figure 7). After this duration, the evolution of the elastic modulus (E) as a function of the penetration depth in the (CHI/BMP-7)₄ functionalized implant (NR4) and in the implant without functionalization (NF) was followed. First, we observe that for all tested penetration depths, the values of the elastic modulus for functionalized implants (NR4) were always greater than for the non-functionalized (NF) one. In Figure 7, the crosses illustrate the confidence interval with 95% of certainty. The regions delimited by each group are clearly separated indicating that the functionalization was effective, leading clearly to overall enhanced elastic modulus. We observe that the elastic

modulus decreases with the indentation depth for both implants. At the surface, bone regeneration seems faster than in the volume. In fact, implant surface was more easily colonized by host osteoblasts than beneath. When cell adhesion and differentiation were achieved a high value for the E at the surface was obtained. Then it is possible to divide the results of E in two parts: the surface ($0 < \text{penetration depth} < 5 \mu\text{m}$) and the volume (penetration depth $> 5 \mu\text{m}$). For NR4 and NF scaffolds, the E values vary from 4 GPa in the first microns to 0.70 GPa at a 5 μm depth, and from 1 GPa in the first microns to 0.21 GPa at 5 μm , respectively. For an indentation depth larger than 5 μm , E values seem to be constant: E = **0.15-0.34** GPa for the NF implant and E = **0.5-1** GPa for the NR4 implant. As a control, elastic modulus of the native bone was measured. In this case, the E values vary from 8.2 to 22 GPa.

Thus, implants composed of 3D nanofibrous PCL and BMP-7 nanoreservoirs can represent a biocompatible material able to accelerate and improve *in vivo* bone regeneration and mineralization but still not sufficient. To further accelerate the speed of bone regeneration, the third generation of biomaterials should be used, by combining not only growth factors but also living cells.

BMP-7 nanoreservoirs and hMSCs can improve and accelerate bone regeneration in vivo

After having analysed the effect of the 3D PCL nanofibrous scaffold and of the BMP-7 nanoreservoirs on bone regeneration and mineralization *in vivo*, we investigated if the addition of hMSCs on this functionalized material could improve efficiency of bone regeneration *in vivo*.

We first analysed the potential of hMSCs to infiltrate PCL thick nanofibrous scaffold *in vitro*. After seeding hMSCs on the thick NR4 or NF scaffold, we have shown that cells colonized both NF and NR4 scaffolds, as demonstrated by the Alamar Blue® experiments ($p > 0.05$ at each time) (Figure S1). Although no significant positive effect of NR4 functionalization on hMSCs proliferation had been found, these results show the biocompatibility of the NR4 3D PCL scaffold with these cells. After 21 days, the immunofluorescence images show good protein expression of the hMSCs seeded onto both scaffolds (NF and NR4) but again there is no really significant effect of the NR4 architecture *in vitro* (Figure S2).

To study the ability of hMSCs to improve bone regeneration and mineralization in the functionalized implants *in vivo*, we analysed calcification of the implants after 30 days *in vivo* by

SEM-EDS X-ray maps (Figure 8). Co-localization of the calcium (Ca) and the phosphorous (P) signals was observed, on the NF and NR4 scaffolds with hMSCs, obtaining a Ca/P weight ratio of 1.35 and 1.65, respectively. To visualize the formation of new bone, calcein was intraperitoneally injected (Figure 9). Figure 9 shows the positive effect of the NR4 architecture compared to NF scaffold in the presence of hMSCs. We had already seen a positive effect of the NR4 functionalization compared to bare scaffold in the absence of hMSCs (Figure 6B). However, the supplementary positive effect of the hMCs can be highlighted when comparing Figure 9 and Figure 6B. Therefore, the double functionalization with BMP-7 and human stem cells (hMSCs) can act as an accelerator of the *in vivo* bone mineralization and regeneration.

Discussion

Thick (CHI/BMP-7)₄ PCL implant as a new material for regenerative medicine

In the last decade, a variety of active biomaterials incorporating biological active molecules have been developed.²³⁻⁴⁹ Recently, using an electrospun PCL nanofibrous thin implant, excellent bone regeneration for small lesions was accomplished, with complete colonization and bone induction inside the scaffold after *in vivo* implantation in mice.²¹ For large lesions, however, the challenge is to develop an approach to induce bone regeneration deep within the implant by using a thick rather than a thin implant.

To achieve robust bone formation on a thick nanofibrous bone implant (~700 μm to 1 cm thick) we have evaluated a new tissue engineering concept combining not only the incorporation of growth factors (BMP-7) within nanoreservoirs but also hMSCs from bone marrow within electrospun PCL nanofibrous scaffolds. Thus, we evaluated whether bone formation can be further improved by incorporating living hMSCs into the electrospun thick nanofibrous implant.

Electrospun nanofibers have extremely high specific surface area, which allows the scaffold to mimic the collagen extracellular matrix. The resulting 3D thick nanofibrous implants are highly porous (above 90%) with excellent pore interconnectivity showing a superposition of thin nanofiber layers. Interactions between the different nanofiber layers occur randomly during

the electrospinning process, which leads to a random pore size distribution. These unique characteristics of nanofiber-based implants are desirable properties for advanced applications.²¹

Thick (CHI/BMP-7)₄ PCL nanofibrous implant for bone regeneration

The characterization of the thick PCL electrospun scaffold showed a highly porous organisation with a structure composed of a superposition of thin nanofibrous layers. Interactions between the different nanofibrous layers occurred randomly during the electrospinning process, which leads to a random distribution of the pores in terms of size. However, because of the interactions between the nanofibrous layers, the pores were not round but presented an elongated shape. Moreover, the elongated filopodia intimately anchored to the nanofibers confirmed a high compatibility between human primary osteoblasts and this thick electrospun nanofibrous PCL scaffold. These results are in agreement with the previous literature.⁴³ However, it seemed that the infiltration of the cells into the porous structure was relatively limited, particularly on day 14 when the cells were at confluence forming a cell film onto the surface of the scaffold, limiting the infiltration of cells deeply inside.

We also analysed the osteogenic differentiation of the human osteoblasts and hMSCs in the presence of (CHI/BMP-7)₄ nanoreservoirs. Osteopontin and BSP11 are proteins secreted in an early stage of bone formation process, thus their expression onto both NF and NR4 scaffolds shows that bone formation was accelerated for human osteoblasts by the scaffold structure. However, the *in vitro* analysis does not enable to conclude that the functionalization of the thick nanofibrous PCL scaffold with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers has an enhanced effect on bone induction compared to the bare scaffold.

After *in vivo* model experimentation however, our results evidently confirmed an excellent osteo-induction of our 3D nanofibrous implants. After 30 days implantation, colonization, migration and even mineralization have already occurred deeply inside the implant, within NR4 compared to NF thick implants (Figure 5, pink area), meaning that an accelerating effect of the (CHI/BMP-7)₄ functionalization occurred. The results showed that the acceleration effect of the (CHI/BMP-7)₄ functionalization has positively affected the NR4 implant. *In vivo* implantations confirmed that our thick PCL scaffold is biocompatible and nontoxic for living organism. It was well integrated by the host, and after 30 days of

implantation, new biomineralized area was detected into the scaffold. The Ca/P values suggest that the presence of CHI/BMP-7 nanoreservoirs enhances bone induction. These results could be explained by the increase in the bone-regeneration speed due to the treatment with CHI/BMP-7. Our results clearly indicate that by the incorporation of BMP-7 as nanoreservoirs for cells, bone regeneration was accelerated 3 times after 30 days, however complete bone regeneration was not yet achieved (Figure 6). We have as well shown that the dispersion of the results for the NR4 implant is greater compared to the NF implant. This could be explained by the action of the active nanoreservoirs of BMP-7 onto the nanofibers of the NR4 implant (Figure 3) during cell colonization, differentiation and bone growth. However after 30 days implantation, by using the thick implant, the bone regeneration is still not sufficient. To further accelerate the speed of bone regeneration, we have combined both growth factors and living cells. In this study human mesenchymal stem cells derived from bone marrow (hMSCs) were used to improve robust bone formation.

Thick PCL nanofibrous implant equipped with BMP-7 and hMSCs to improve robust bone engineering

The objective of this study was to analyse the ability of the living implants to accelerate osteogenic differentiation and bone regeneration. For this aim, we have used thick PCL nanofibrous implants seeded with hMSCs derived from bone marrow without or with active nanoreservoirs of BMP-7 and followed bone regeneration *in vitro* and *in vivo* in mice. Although expression of BSP1 and osteocalcin of hMSCs was obtained at an early stage on both scaffolds, the *in vitro* model does not enable to establish a significant enhancement effect of the NR4 nanofunctionalization, compared to the bare scaffold. However, *in vivo*, we have shown that after adding hMSCs, significant bone growth can be induced by our nanocontainers of BMP-7 (NR4) (Figure 9). Here we must precise that the absence of bioactive effect potentially due to chitosan instead of BMP-7 had been previously proved in experiments involving nanoreservoirs of chitosan/BSA (Bovine Serum Albumin protein).⁴⁶ Interestingly, by seeding our NR4 implant with hMSCs we have shown more newly mineralized bone, which covered nearly completely the bone defect. Control groups comprising NR4 scaffold-only implants without adding stem cells resulted only in partial re-mineralization. These results point to an increase in

the bone regeneration speed due to the double functionalization with BMP-7 and living stem cells.

Conclusion

Nanostructured and living biomaterials by incorporation of active therapeutics and stem cells, for use in surgical implantations, could lead to shorter recovery times and decreased risk of post-operative infections or other complications. Such innovative technology will improve the quality of life and could reduce costs. Here we report the development and therapeutic impact of advanced living implants combining nanostructured biomaterials with hMSCs, which resulted in superior bone formation *in vivo* throughout a thick electrospun nanofibrous PCL scaffold. The bi-functionalized living implant depicted in this article enables accelerated bone regeneration *in vivo*, this being a positive aspect to avoid inflammation in the implantation site; its nanoreservoirs provide a sustainable source of growth factor for the osteoconductive cells, which is financially and physiologically beneficial for the future patient, as it enables efficient low-dose action, compared to current alternatives in the clinic; and above all, it enables regeneration in large size defects, which was the challenge to tackle. We believe that this double functionalization could lead to a new generation of engineered bone implants. This concept could be used for other tissue-engineering applications.

Acknowledgments

The authors thank Jean-Luc Weickert for his help with SEM acquisition, Hervé Gégout for histology, Leandro Jacomine and Christian Gauthier for the nanoindentation experiments and analysis. This work was supported by the project NeoTissage and NanoOSCAR from the "Agence Nationale de la Recherche, ANR". N.J. is indebted to CHU de Nancy, Hôpital Central, "Chirurgie Orthopédique et Traumatologie" (Contrat d'interface INSERM vers l'hôpital).

Author contributions

¹ These authors have equally contributed to this work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*. 2012;338(6109):917-921. doi:10.1126/science.1222454.
2. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*. 2004;4(8):743-765. doi:10.1002/mabi.200400026.
3. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* 2011;9(1):66. doi:10.1186/1741-7015-9-66.
4. Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita M, Kitamura C, Fukushima H. The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects. *International Journal of Dentistry* 2012;2012:e148261. doi:10.1155/2012/148261.
5. Giannoudis PV, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury*. 2009;40 Suppl 3:S1-3. doi:10.1016/S0020-1383(09)00642-1.
6. Lee JA, Krogman KC, Ma M, Hill RM, Hammond PT, Rutledge GC. Highly Reactive Multilayer-Assembled TiO₂ Coating on Electrospun Polymer Nanofibers. *Adv Mater*. 2009;21(12):1252-1256. doi:10.1002/adma.200802458.
7. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(14):1413-1433. doi:10.1016/j.addr.2007.04.022.
8. Yoo HS, Kim TG, Park TG. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(12):1033-1042. doi:10.1016/j.addr.2009.07.007.
9. Fioretti F, Mendoza-Palomares C, Helms M, et al. Nanostructured Assemblies for Dental Application. *ACS Nano*. 2010;4(6):3277-3287. doi:10.1021/nn100713m.
10. Tang Z, Wang Y, Podsiadlo P, Kotov NA. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. *Advanced Materials*. 2006;18(24):3203–3224. doi:10.1002/adma.200600113.
11. Lynn DM. Layers of Opportunity: Nanostructured Polymer Assemblies for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Soft Matter* 2006; 2: 269-273.
12. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science*. 1997;277(5330):1232-1237. doi:10.1126/science.277.5330.1232.

13. Jessel N, Atalar F, Lavallo P, et al. Bioactive Coatings Based on a Polyelectrolyte Multilayer Architecture Functionalized by Embedded Proteins. *Advanced Materials*. 2003;15(9):692–695. doi:10.1002/adma.200304634.
14. Benkirane-Jessel N, Lavallo P, Meyer F, et al. Control of Monocyte Morphology on and Response to Model Surfaces for Implants Equipped with Anti-Inflammatory Agent. *Advanced Materials*. 2004;16(17):1507–1511. doi:10.1002/adma.200306613.
15. Benkirane-Jessel N, Schwinté P, Falvey P, et al. Build-up of Polypeptide Multilayer Coatings with Anti-Inflammatory Properties Based on the Embedding of Piroxicam–Cyclodextrin Complexes. *Advanced Functional Materials*. 2004;14(2):174–182. doi:10.1002/adfm.200304413.
16. Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, et al. Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(23):8618–8621. doi:10.1073/pnas.0508246103.
17. Kim B-S, Park SW, Hammond PT. Hydrogen-Bonding Layer-by-Layer-Assembled Biodegradable Polymeric Micelles as Drug Delivery Vehicles from Surfaces. *ACS Nano*. 2008;2(2):386–392. doi:10.1021/nn700408z.
18. Benkirane-Jessel N, Lavallo P, Hübsch E, et al. Short-Time Tuning of the Biological Activity of Functionalized Polyelectrolyte Multilayers. *Advanced Functional Materials*. 2005;15(4):648–654. doi:10.1002/adfm.200400129.
19. Dierich A, Le Guen E, Messaddeq N, et al. Bone Formation Mediated by Synergy- Acting Growth Factors Embedded in a Polyelectrolyte Multilayer Film. *Advanced Materials*. 2007;19(5):693–697. doi:10.1002/adma.200601271.
20. Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C, et al. Active multilayered capsules for in vivo bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(8):3406–3411. doi:10.1073/pnas.0908531107.
21. Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, et al. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano*. 2012;6(1):483–490. doi:10.1021/nn203817t.
22. Leguen E, Chassepot A, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C, Jessel N. Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs. *Biomol. Eng.* 2007;24(1):33–41. doi:10.1016/j.bioeng.2006.05.023.

23. Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J. Clinical Application of Human Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells International*. 2010;2010. doi:10.4061/2010/215625.
24. Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science*. 1994;263(5154):1715-1720.
25. Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (NY)*. 1995;13(6):565-576.
26. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004;428(6982):487-492. doi:10.1038/nature02388.
27. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002;295(5557):1009-1014. doi:10.1126/science.1069210.
28. Chaikof EL, Matthew H, Kohn J, Mikos AG, Prestwich GD, Yip CM. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;961:96-105.
29. Yang C, Hillas PJ, Báez JA, et al. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs*. 2004;18(2):103-119.
30. Kumar G, Tison CK, Chatterjee K, et al. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials*. 2011;32(35):9188-9196. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.054.
31. Pulella SR, Andres C, Chen W, Xu C, Wang L, Kotov NA. Permselectivity Replication of Artificial Glomerular Basement Membranes in Nanoporous Collagen Multilayers. *J Phys Chem Lett*. 2011;2(16):2067-2072. doi:10.1021/jz200880c.
32. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(1):61-86. doi:10.1089/teb.2007.0150.
33. Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(1):13-22. doi:10.1038/nnano.2010.246.
34. Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol*. 2002;20(11):1111-1117. doi:10.1038/nbt751.
35. Choi J-Y, Jung H-J, Park B-J, Joung Y-K, Park K-D, Han D-K. Adhesion Behavior of Chondrocyte and Osteoblast on Surface-Modified Biodegradable PLLA Films and

- Scaffolds. *Polymer Korea*. 2012;36(3):357-363. doi:10.7317/pk.2012.36.3.357.
36. Berth G, Voigt A, Dautzenberg H, Donath E, Möhwald H. Polyelectrolyte complexes and layer-by-layer capsules from chitosan/chitosan sulfate. *Biomacromolecules*. 2002;3(3):579-590.
 37. Hiller J, Mendelsohn JD, Rubner MF. Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. *Nat Mater*. 2002;1(1):59-63. doi:10.1038/nmat719.
 38. Jessel NB, Schwinté P, Donohue R, et al. Pyridylamino- β -cyclodextrin as a Molecular Chaperone for Lipopolysaccharide Embedded in a Multilayered Polyelectrolyte Architecture. *Advanced Functional Materials*. 2004;14(10):963–969. doi:10.1002/adfm.200305089.
 39. Gangloff SC, Ladam G, Dupray V, et al. Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Biomaterials*. 2006;27(9):1771-1777. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.10.001.
 40. Zhang X, Sharma KK, Boeglin M, et al. Transfection ability and intracellular DNA pathway of nanostructured gene-delivery systems. *Nano Lett*. 2008;8(8):2432-2436. doi:10.1021/nl801379y.
 41. Lee J, Kotov NA. Notch ligand presenting acellular 3D microenvironments for ex vivo human hematopoietic stem-cell culture made by layer-by-layer assembly. *Small*. 2009;5(9):1008-1013. doi:10.1002/sml.200801242.
 42. Shim BS, Podsiadlo P, Lilly DG, et al. Nanostructured thin films made by dewetting method of layer-by-layer assembly. *Nano Lett*. 2007;7(11):3266-3273. doi:10.1021/nl071245d.
 43. Kenawy ER, Layman JM, Watkins JR, et al. Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials*. 2003;24(6):907-913.
 44. Eap S, Ferrand A, Schiavi J, et al. Collagen implants equipped with “fish scale”-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond)*. 2013. doi:10.2217/nnm.13.122.
 45. Eap S, Keller L, Ferrand A, et al. Nanomechanical properties of active nanofibrous implants after *in vivo* bone régénération. *Nano LIFE*. 2013;1450001.

doi:10.1142/S1793984414500019.

46. Ferrand A, Eap S, Richert L, et al. Osteogenetic Properties of Electrospun Nanofibrous PCL Scaffolds Equipped With Chitosan-Based Nanoreservoirs of Growth Factors. *Macromol Biosci*. 2013. doi:10.1002/mabi.201300283.
47. Eap S, Ferrand A, Palomares CM, et al. Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 2012;22(1-3):137-141. doi:10.3233/BME-2012-0699.
48. Kan Q, Yan W, Kang G, Sun Q. Oliver–Pharr indentation method in determining elastic moduli of shape memory alloys—A phase transformable material. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2013;61(10):2015-2033. doi:10.1016/j.jmps.2013.05.007.
49. Shah NJ, Hong J, Hyder MN, Hammond PT. Osteophilic multilayer coatings for accelerated bone tissue growth. *Adv Mater Weinheim*. 2012;24(11):1445-1450. doi:10.1002/adma.201104475.

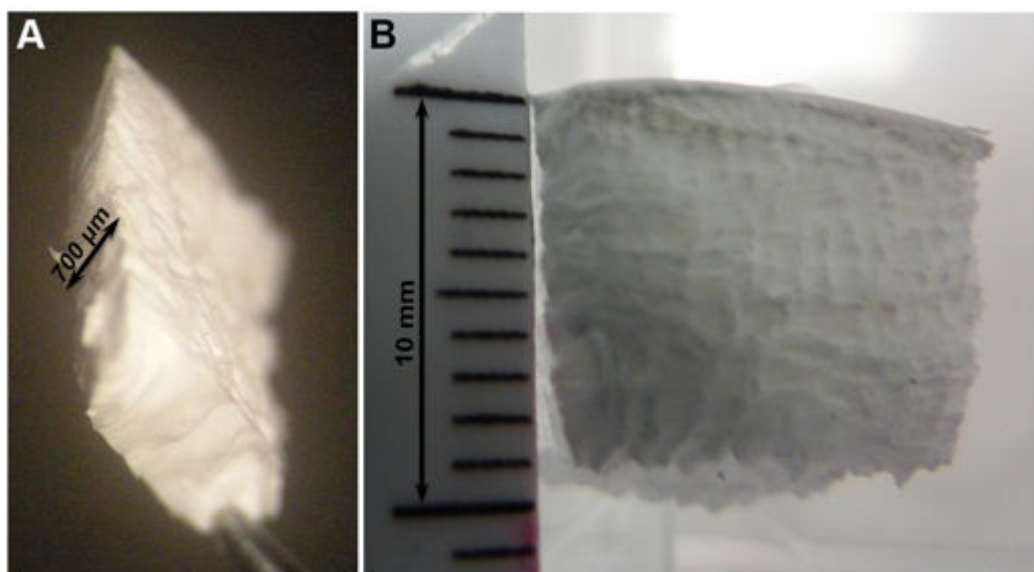


Figure 1 Macroscopic aspect of thick Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) electrospun nanofibrous membrane, 700 μm thickness (**A**) and 1 cm thickness (**B**).

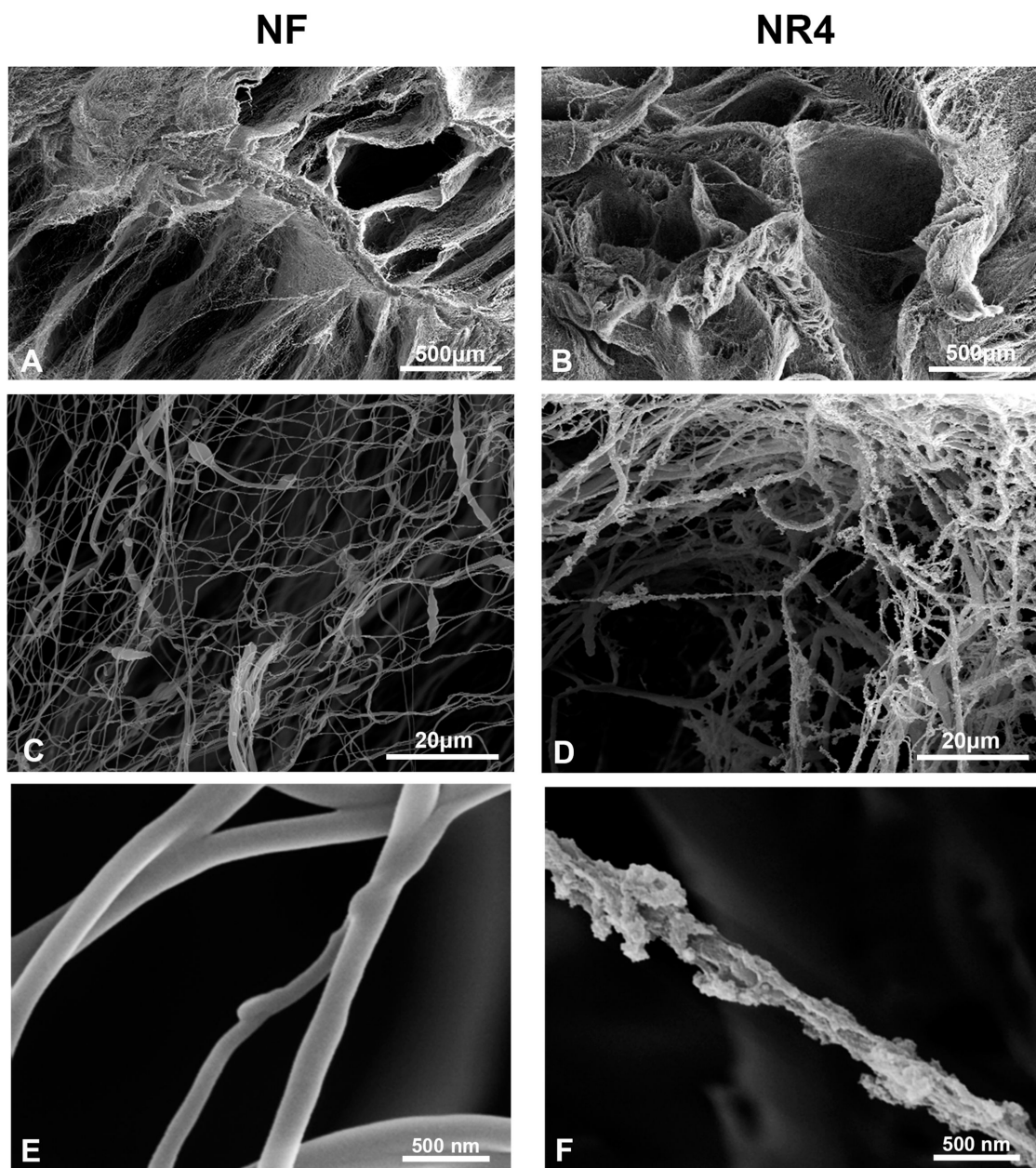
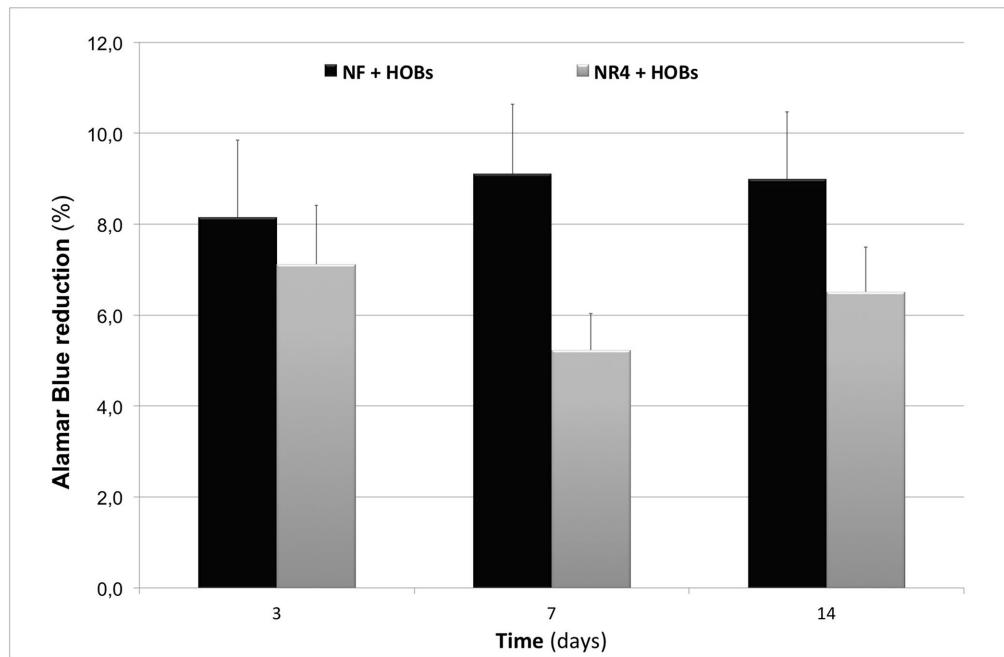


Figure 2 SEM images of PCL electrospun nanofibrous 3D scaffold, respectively not functionalized (NF) (**A, C, E**) and functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers (NR4) (**B, D, F**) : at 500 μm (A, B), at 20 μm (C, D) and at 500 nm (E, F).

Abbreviations: NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers.

A



B

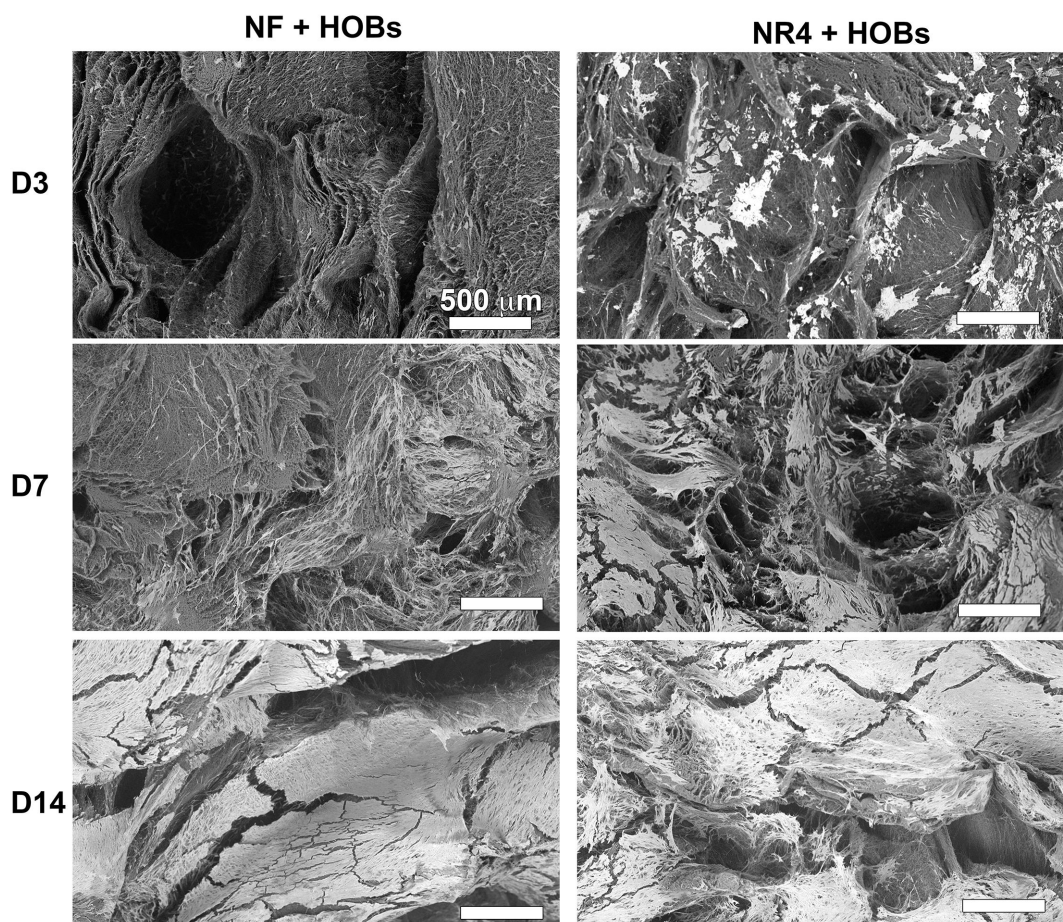


Figure 3 Biocompatibility analysis of the PCL electrospun nanofibrous 3D scaffold in the presence of human osteoblasts. **(A)** % Alamar Blue reduction showing the metabolic activity of the cells at 3, 7, and 14 days of culture on the 3D scaffolds. $n=9$, $p>0.05$ each time. Bars = standard deviation. **(B)** SEM images of PCL nanofibrous scaffold without functionalization (NF) and functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers (NR4) seeded with human primary osteoblasts, after 3, 7, and 14 days respectively. For all images scale bars = 500 μm .

Abbreviations: NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers; HOBs, human osteoblasts.

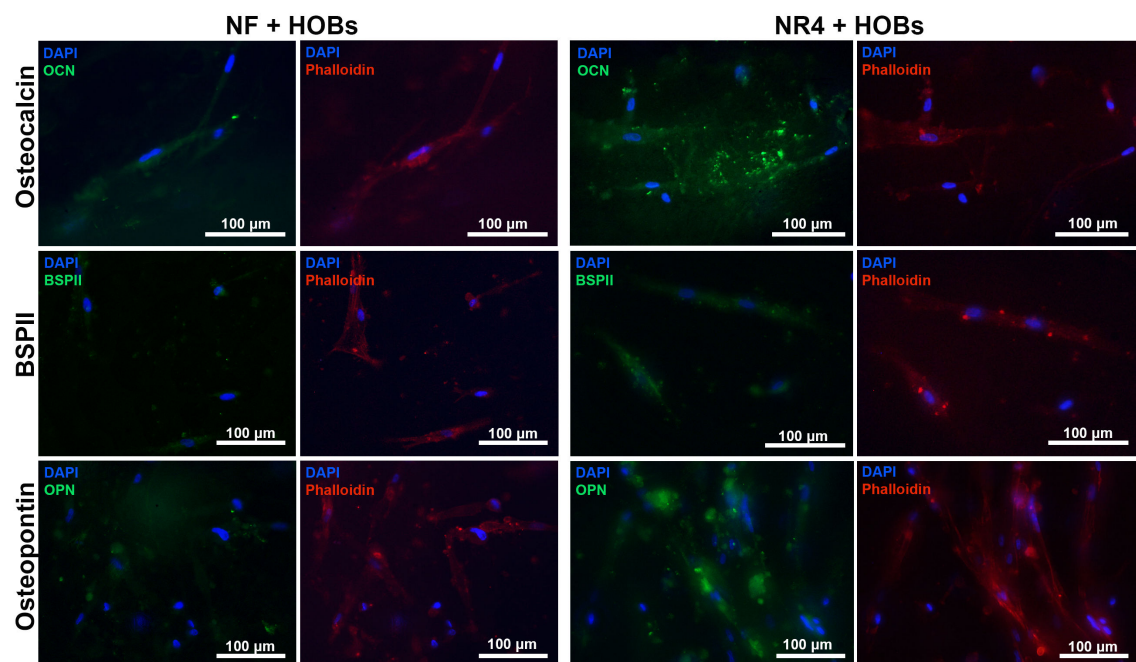


Figure 4 *In vitro* effect of BMP-7 nanoreservoirs on osteogenic differentiation of human osteoblasts. *In vitro* expression of osteocalcin, BSP II, and osteopontin in human primary osteoblasts after 21 days of cell culture onto the PCL bare scaffolds (**NF**) or equipped with BMP-7 nanocontainers (**NR4**). Nucleus was stained with DAPI (in blue), actin-phalloidin (in red) and osteocalcin, BSP II, and osteopontin were stained in green. For all images scale bars = 100 μm .

Abbreviations: BSP II, bone sialoprotein II; HOBs, human primary osteoblasts; NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers.

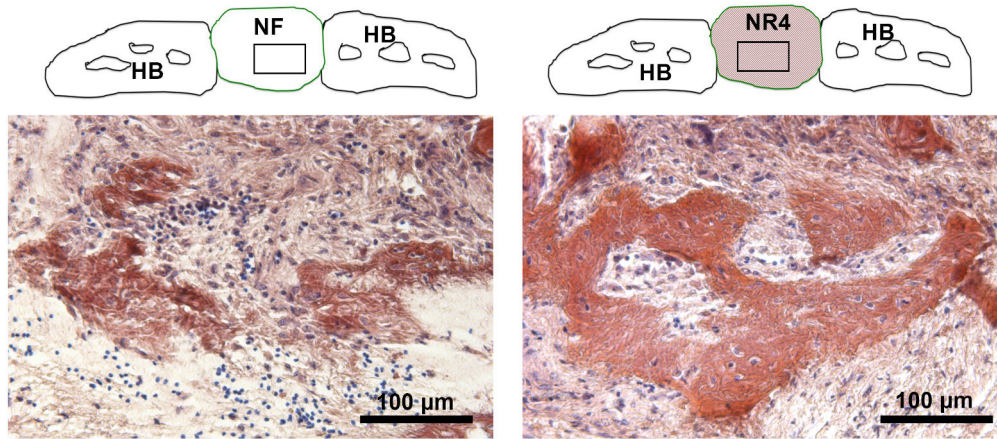


Figure 5 Histological analysis of the effect of BMP-7 nanoreservoirs *in vivo* on bone tissue regeneration. Histological analysis of *in vivo* bone induction onto PCL scaffold functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanoreservoirs (**NR4**) compared to bare PCL (**NF**) scaffold after 30 days of calvaria implantation in mice: Mallory coloration was used in order to identify mineralized ECM (pink) and cell nuclei (blue). The square area in the drawn scheme represents the histological section inside the calvaria mice defect.

Abbreviations: HB, host bone; NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers.

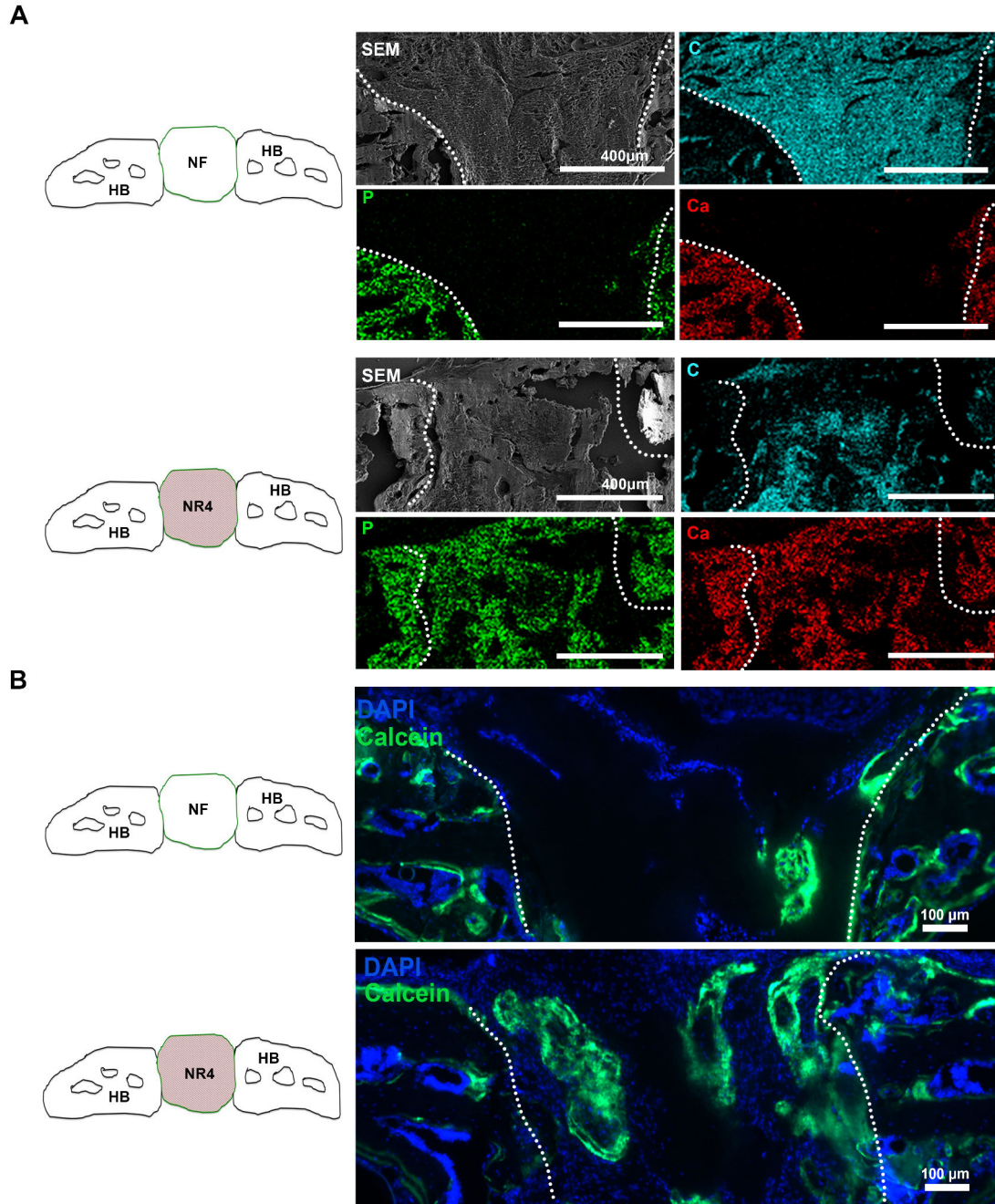


Figure 6 BMP-7 nanoreservoirs effect *in vivo* on bone mineralization. **(A)** SEM micrographs, after 30 days of implantation in mice skull, showing the morphology and composition of the scaffolds; Corresponding elemental mapping of phosphorous (green), calcium (red) and carbon (blue) is depicted. Overall SEM visualization of the grafts is in grey. **(B)** *In vivo* bone induction onto NF scaffold or onto NR4 PCL scaffold 30 days after calvaria implantations in nude mice. Cell nucleus is in blue, stained with DAPI; bone in formation is shown in green, stained with calcein. For all images scale bars = 100 μm.

Abbreviations: C, carbon; Ca, calcium; HB, host bone; NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers; P, phosphorus; SEM, scanning electron microscopy.

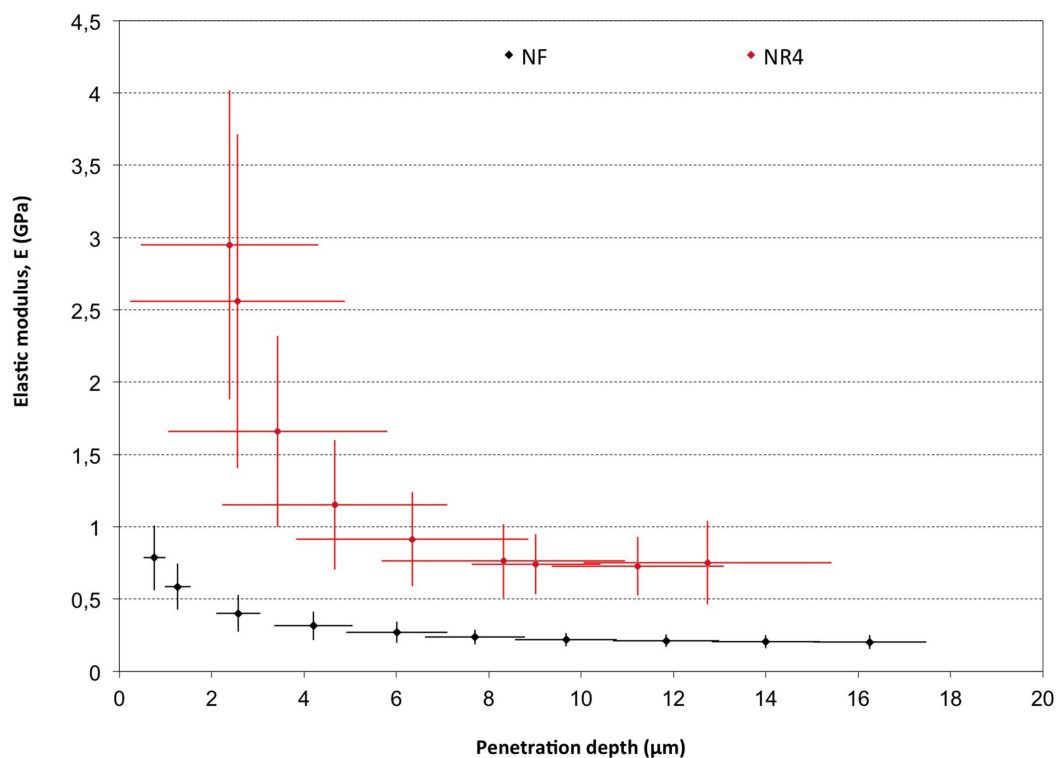


Figure 7 Nanoindentation analysis of the BMP-7 nanoreservoirs effect on the implants. Elastic modulus (E) in function of penetration depth of nanoindentations carried out onto (CHI/BMP-7)₄ functionalized implant (NR4) and not functionalized implant (NF) after 30 days implantation in mice calvaria.

Abbreviations: NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers.

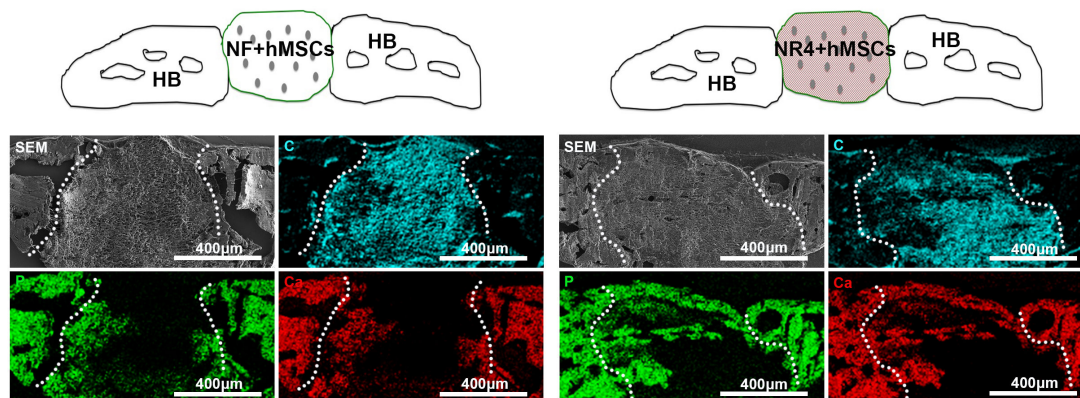


Figure 8 *In vivo* analysis of combined BMP-7 and hMSCs on bone tissue calcification. SEM micrographs showing the morphology and elemental composition of the NF and NR4 scaffolds seeded with hMSCs after 30 days of implantation in mice skull. Elemental mapping of phosphorous (green), calcium (red) and carbon (blue) is depicted. Overall SEM visualization of the grafts is in grey. For all images scale bars = 400 μm .

Abbreviations: C, carbon; Ca, calcium; HB, host bone; hMSCs, human mesenchymal stem cells; NF, not functionalized; NR4, functionalized with $(\text{CHI/BMP-7})_4$ nanocontainers; P, phosphorus; SEM, scanning electron microscopy.

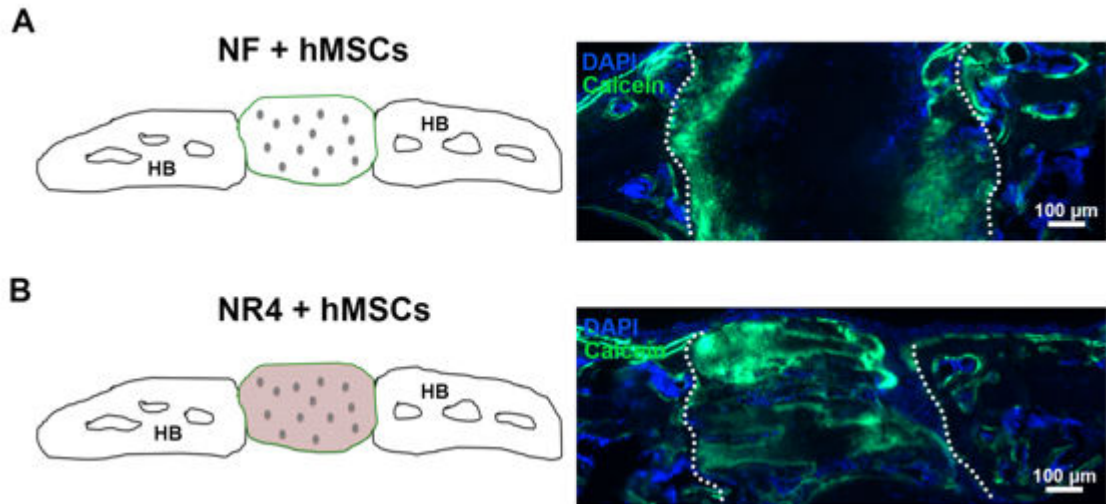


Figure 9 *In vivo* analysis of BMP-7 nanoreservoirs and hMSCs effect on bone tissue mineralization. *In vivo* bone induction onto NF PCL scaffold with hMSCs (**A**) or onto NR4 PCL scaffold with hMSCs (**B**) 30 days after calvaria implantation in nude mice. Cell nucleus is in blue, stained with DAPI; bone in formation is shown in green, stained with calcein. For all images scale bars = 100 μm.

Abbreviations: HB, host bone; hMSCs, human mesenchymal stem cells; NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers.

Supplementary materials

Supplementary materials include 2 Supplementary figures

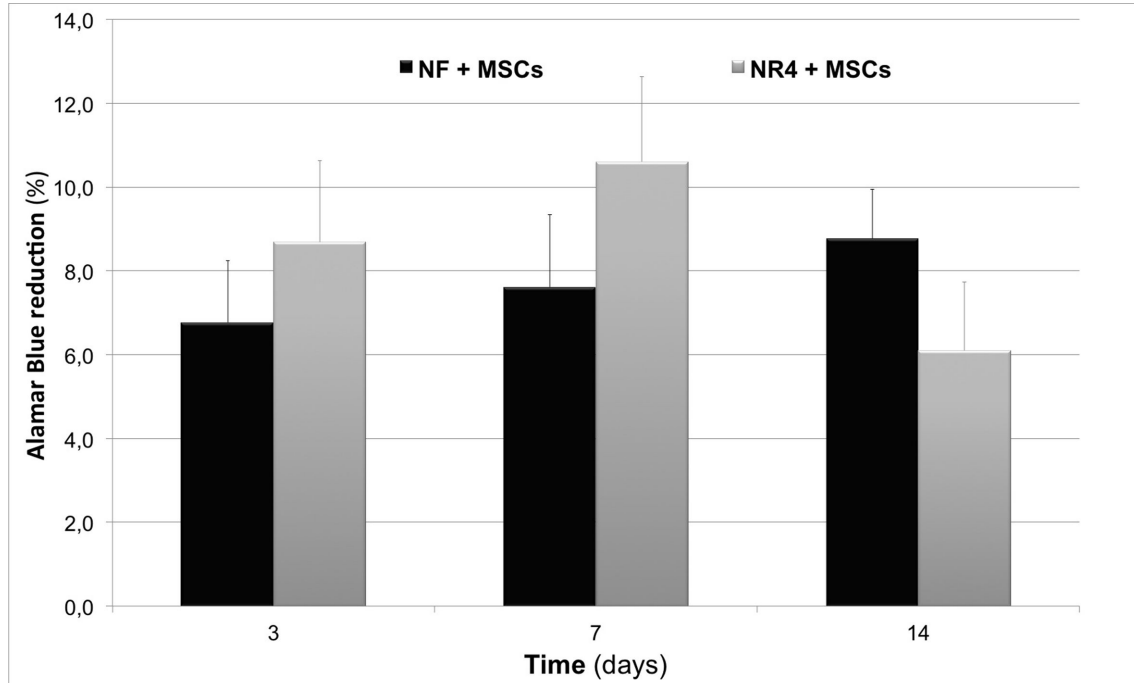


Figure S1 *In vitro* metabolic activity of hMSCs on the nanofunctionalized PCL scaffold. % Alamar Blue reduction on the thick nanofiber implant without BMP-7 (**NF**) or functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers (**NR4**) at 3 days, 7 days, and 14 days. n=9, p> 0.05 each time. Scale bars = standard deviation.

Abbreviations: hMSCs, human mesenchymal stem cells; NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers.

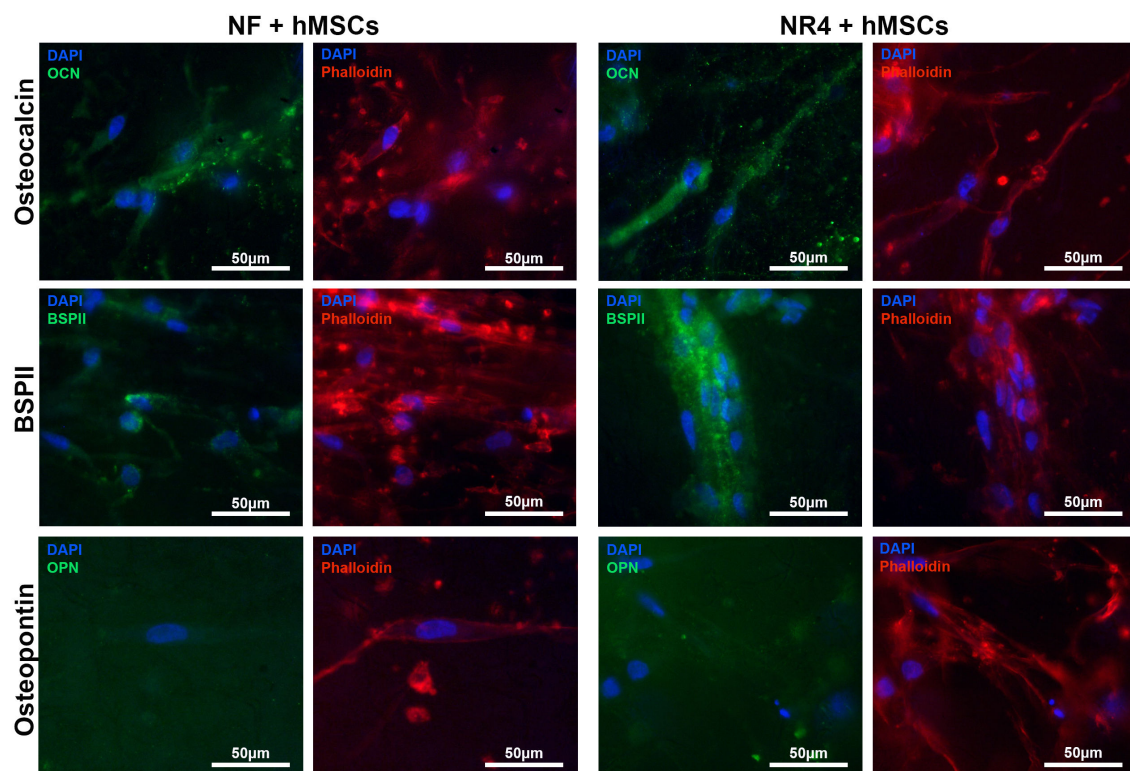


Figure S2 *In vitro* expression of osteocalcin, osteopontin and BSP-II in hMSCs after 21 days of cell culture on bare PCL 3D scaffolds (**NF**) or equipped with BMP-7 nanocontainers (**NR4**). Nucleus was stained with DAPI (in blue), actin-phalloidin (in red), osteocalcin, osteopontin and BSP-II were stained in green. For all images scale bars = 50 μm.

Abbreviations: BSP-II, bone sialoprotein II; hMSCs, human mesenchymal stem cells; NF, not functionalized; NR4, functionalized with (CHI/BMP-7)₄ nanocontainers.

V. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Notre équipe a développé une stratégie de fonctionnalisation d'implants nanofibreux synthétiques à base de nanoréservoirs actifs pour la médecine régénérative osseuse. Ces implants synthétiques que nous avons développés représentent un choix alternatif aux membranes de collagène d'origine animale déjà commercialisées et utilisées en clinique. Notre stratégie de fonctionnalisation tout d'abord appliquée aux membranes de collagène existantes sur le marché a permis de valider l'efficacité de nos nanoréservoirs actifs. Cette stratégie consiste à produire des nanoréservoirs de chitosane, contenant le facteur ostéoinducteur, la protéine morphogénique osseuse 2 (BMP-2), afin d'enrober les fibres de la membrane de collagène. Notre stratégie a été validée *in vitro* en utilisant des ostéoblastes humains primaires et *in vivo* grâce à des implantations en site osseux chez le modèle murin. L'efficacité des nanoréservoirs actifs fonctionnalisant les membranes de collagène a ainsi été mise en évidence par une accélération de la régénération osseuse *in vivo*.

D'autre part, des membranes fines et synthétiques de polycaprolactone (PCL) nanofibreuses ont été obtenues par électrospinning. Les nanofibres de PCL ont ensuite été enrobées de nanoréservoirs actifs à base de chitosane ou de poly(L-lysine) (PLL) contenant la BMP-2. L'étude a permis de comparer différents nanoréservoirs et leur efficacité en terme de régénération osseuse. L'induction osseuse engendrée par ces réservoirs actifs a été mise en évidence *in vitro*. Une différence d'efficacité entre les nanoréservoirs de chitosane et de PLL a été mise en évidence par des expérimentations *in vivo* chez le modèle murin. Les implantations en calvaria ont permis de confirmer une plus grande efficacité des nanoréservoirs actifs de chitosane fonctionnalisant la membrane fine de PCL sur l'accélération de la régénération osseuse.

Cependant, ces membranes fines comme leur nom l'indique restent faibles en épaisseur (moins d'un millimètre) limitant leur champ d'application en terme de lésions osseuses. Afin d'élargir les possibilités d'application, nous avons développé un nouveau type de structures électrospinnées de PCL appelées implants 3D épais dont l'épaisseur atteint le centimètre. L'optimisation de l'élaboration des implants 3D ainsi que leur caractérisation ayant été réalisées *in vitro*, le potentiel de tels implants à induire une régénération osseuse *in vivo* a été établi chez le modèle murin.

Enfin, afin de pouvoir régénérer plus rapidement des lésions osseuses de grande taille, l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) combinées à des nanoréservoirs actifs de chitosane incorporant la protéine morphogénique osseuse 7 (BMP-7) a été mise en œuvre et a permis de rendre nos implants bioactifs et vivants. Cette stratégie de double fonctionnalisation a été validée *in vitro* en utilisant des ostéoblastes humains primaires et des CSMs dérivées de la moelle osseuse. Des expérimentations chez le modèle murin ont ensuite confirmé que l'effet combiné des nanoréservoirs actifs et des CSMs fonctionnalisant l'implant 3D a rendu possible une très nette accélération de la régénération osseuse *in vivo*. La double fonctionnalisation des implants 3D a permis le développement d'un nouveau type de biomatériau actif et vivant qui permettrait de réduire les temps de guérison et d'améliorer les soins des patients.

Par ailleurs, l'activité de ces implants fonctionnalisés par des nanoréservoirs de BMP-2 est en cours d'analyse dans le cadre de tests précliniques pour une application maxillo-faciale, parodontale et orthopédique en vue d'obtenir un marquage CE. De plus, une start-up (ARTiOS NanoMed) a été créée en vue de développer ces produits innovants.

De nombreuses perspectives s'ouvrent à nous concernant la suite du travail effectué sur la stratégie de fonctionnalisation de ces structures nanofibreuses fines et épaisses de PCL. En effet, différents principes actifs chargés pourraient être utilisés pour d'autres domaines d'applications. Il serait possible d'incorporer un anti-inflammatoire et un anti-cancéreux afin de contrôler l'inflammation au site de l'implantation mais également de prévenir les récurrences de métastases osseuses au niveau d'une résection tumorale. Et des perspectives favorables sont envisagées dans le domaine de la recherche sur des anti-inflammatoires pouvant être incorporés pour une application dans le domaine du traitement des maladies parodontales.

Des perspectives visant à mimer la phase minérale de la matrice extracellulaire pourraient également être intéressantes. Dans ce but, l'incorporation de nanoparticules d'hydroxyapatite (HAp) au sein des fibres de l'implant, ou encore la cristallisation d'HAp à la surface des fibres pourraient être envisagées.

D'autre part, nous envisageons également une application ostéoarticulaire de nos implants. En effet, un meilleur contrôle de la porosité ainsi que la mise en place d'un gradient de la distribution et de la taille des pores dans l'épaisseur de la membrane pourraient être envisagés pour réparer l'os sous-chondral. L'os sous-chondral de part sa situation

intermédiaire entre l'os et le cartilage possède une structure et une fonction très particulières. Il joue un rôle crucial en permettant la jonction entre l'os et le cartilage. Ainsi, lorsque le cartilage non vascularisé et non innervé est endommagé de façon irréversible, l'os sous-chondral est à sa suite endommagé. Les recherches s'étaient tout d'abord concentrées sur la régénération osseuse seule ou sur la réparation du cartilage seul. En effet, il est aujourd'hui possible de réparer un cartilage endommagé partiellement par endoscopie. Récemment, en médecine régénérative, une tentative de régénération cartilagineuse a été mise en oeuvre (phase clinique) en utilisant un implant à base d'hydrogel d'agar et d'alginate mélangé aux chondrocytes autologues (CARTIPATCH® de TBF Génie Tissulaire, France) (Neyret et al., 2007). Cependant, cette solution n'est que partielle car le cartilage régénéré repose sur un socle osseux endommagé (Galois et al., 2004; Galois et al., 2005). La solution idéale serait de régénérer à la fois l'os sous-chondral et le cartilage. Au sein de notre laboratoire en collaboration avec le service d'orthopédie de Nancy (Prof Didier Mainard) et l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissue (UTCT, Profs Jean François Stoltz et Danièle Bensoussan), nous nous sommes concentrés vers des solutions permettant la régénération de l'unité os/cartilage. À cette fin, il est prévu le développement d'un implant hybride capable d'aider non seulement à la régénération de l'os sous-chondral mais également du cartilage hyalin associé. En combinant une membrane nanofibreuse microporeuse et un gel d'alginate contenant des cellules (chondrocytes ou cellules souches du patient), une étude permettrait d'évaluer l'efficacité d'un tel implant hybride à régénérer l'unité os/cartilage. Des implantations articulaires chez la brebis seront effectuées puis analysées finement afin d'évaluer la capacité de ces implants hybrides à induire une régénération stable de l'os sous-chondral et du cartilage.

Ces nombreuses perspectives de recherches montrent la voie qui est ouverte au développement des technologies pour la santé dans le but de toujours tenter d'améliorer les conditions de soins et de réduire la souffrance des patients.

VI. ANNEXES

Annexe 1

- Eap S, Bécavin T, Kokten T, Keller L, Fioretti F, Weickert J-L, Deveau E, Benkirane-Jessel N & Kuchler-Bopp S (2014). Nanofibers Implant Functionalized by NGF as New Strategy to Innervate Bioengineered Tooth. *Adv Health Care Material* 3(3):386-91.

Nanofibers Implant Functionalized by Neural Growth Factor as a Strategy to Innervate a Bioengineered Tooth

Sandy Eap, Thibault Bécavin, Laetitia Keller, Tunay Kökten, Florence Fioretti,
Jean-Luc Weickert, Etienne Deveaux, Nadia Benkirane-Jessel,* and Sabine Kuchler-Bopp

Current strategies for jaw reconstruction require multiple procedures, to repair the bone defect, to offer sufficient support, and to place the tooth implant. The entire procedure can be painful and time-consuming, and the desired functional repair can be achieved only when both steps are successful. The ability to engineer combined tooth and bone constructs, which would grow in a coordinated fashion with the surrounding tissues, could potentially improve the clinical outcomes and also reduce patient suffering. A unique nanofibrous and active implant for bone–tooth unit regeneration is demonstrated and also the innervation of this bioengineered tooth. A nanofibrous polycaprolactone membrane is functionalized with neural growth factor, along with dental germ, and tooth innervation follows. Such innervation allows complete functionality and tissue homeostasis of the tooth, such as dentinal sensitivity, odontoblast function, masticatory forces, and blood flow.

The materials focus is limited to three-dimensional applications and emerging classes of polymeric biomimetic materials, such as nanofibrillar and supramolecular materials formed by self-assembly processes. The guidance provided by biomaterials may facilitate restoration of structure and function of damaged or dysfunctional tissues. Such materials should provide provisional 3D support to interact with cells to control their function, guiding the spatially and temporally complex multicellular processes of tissue formation and regeneration.^[1–6]

The ultimate goal of regenerative therapy is to develop fully functioning bioengineered organs that work in cooperation with surrounding tissues to replace damaged organs. Our understanding of

embryonic development and tissue engineering technology has influenced regenerative therapy. The strategy to develop a bioengineered tooth after the loss of deciduous and permanent teeth is to properly mimic the processes which occur during embryonic development through the reconstitution of a bioengineered tooth germ in vitro.^[7,8] Tooth replacement regenerative therapy, which is also induced by epithelial and mesenchymal interactions during the development,^[7] could be a model system to evaluate not only tooth development but also the revascularization and the re-innervation of this bioengineered tooth.

Recently, the fibrillar architecture of natural extracellular matrix (ECM) components has inspired several researchers to produce materials with similar structure.^[9,10] Polymer processing technologies such as electrospinning^[11] allow fiber formation down to the 10-nm scale. One difficulty in nanofiber technology has been in placing cells within a nanofibrillar structure with pore spaces much smaller than a cellular diameter; somehow the network must be formed in situ, around the cells, without cellular damage.

In recent years, considerable effort has been devoted to the design and controlled fabrication of structured matrices with functional properties.^[12–23] Therapeutics and biomolecules including peptides, proteins, and nucleic acids have been incorporated into multilayered films, which offer new opportunities for the preparation of functionalized bioactive coatings.^[13–15] These nanoarchitectures can be designed to exhibit specific properties, including control of cell activation.^[16–20] Degradable layered structures would be profitable for progressive delivery of associated active agents.^[21,23–29]

1. Introduction

Tissue engineering is an interdisciplinary field in which a variety of processing methods have been utilized with synthetic and natural polymers to fabricate scaffolds for the regeneration of tissues and organs. The study of structure–function relationships in both normal and pathological tissues has been coupled with the development of biologically active substitutes or engineered materials.

S. Eap, T. Bécavin, Dr. L. Keller, T. Kökten, Dr. F. Fioretti,
Dr. N. Benkirane-Jessel, Dr. S. Kuchler-Bopp
Institut National de la Santé et de la Recherche
Médicale (INSERM), UMR 1109,
Osteoarticular and Dental Regenerative
Nanomedicine, Faculté de Médecine,
67085 Strasbourg Cedex, France
Université de Strasbourg
Faculté de Chirurgie Dentaire
1 place de l'Hôpital, 67000, Strasbourg, France
E-mail: nadia.jessel@inserm.fr



J.-L. Weickert
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Service de Microscopie Electronique
1 rue 67404 Illkirch CEDEX, France
T. Bécavin, Prof. E. Deveaux
Université Lille Nord de France
Faculté de Chirurgie Dentaire
INSERM UMR 1008 "Controlled Drug Delivery Systems
and Biomaterials", 59006, Lille, France

DOI: 10.1002/adhm.201300281

Different studies report the use of polyglycolic acid or collagen sponge for bone and tooth regeneration.^[30–32] However, it has also been reported that collagen sponge scaffold is superior to the polyglycolic acid fiber mesh scaffold for tooth tissue engineering.^[32] To mimic the collagen matrix, different groups reported the possibility to electrospin different kinds of polymers.^[33] Different studies also reported cell electrospinning.^[34] These authors demonstrated that living organisms can be directly electrospun successfully, as fine composite threads that encapsulate a biosuspension containing living cells, by using a coaxial needle configuration and a biocompatible polymer.^[34,35]

Here we use an FDA-approved polymer poly(ϵ -caprolactone), PCL, as a matrix. Herein, we produce a PCL-nanofiber electrospun membrane with the possibility to incorporate active molecules in the nanofiber coating. Our strategy is based on an active PCL membrane. PCL is degraded by hydrolysis of its ester linkages under physiological conditions (such as in the human body) and has therefore received a great deal of attention for use as an implantable biomaterial.^[29] In a previous study, we used an electrospun PCL membrane functionalized with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2),^[29] as substrate to induce bone regeneration. We have as well used this PCL membrane without functionalization for bone–tooth unit regeneration.^[36] Herein we have chosen to functionalize our membrane with neural growth factor (NGF). It is reported that p75 neurotrophin receptor,^[37] which is the receptor of NGF, is localized in dental pulp and expressed by the fibroblasts particularly near the odontoblastic layer. Thus, in this study, NGF has been chosen to induce the innervation of bioengineered tooth from dental germ. We have also used the same method as before to functionalize nanofibrous PCL membrane by NGF and followed the tooth innervation.

2. Results and Discussion

We first followed the regeneration of a tooth on our electrospun PCL membrane. For this aim, the first lower molars from embryonic day ED14 (tooth germ) were cultured, for 5 days and 10 days on semisolid medium as a control and on our implant membrane (Mb; Figure S1, Supporting Information). After 5 days of culture on our PCL membrane (Figure S1,B,C, Supporting Information), like on our control (Figure S1A, Supporting Information), the first lower molar reached a stage where epithelial histogenesis was achieved, showing distinct inner (IDE) and outer dental epithelium, stellate reticulum (SR) and stratum intermedium (SI). Cusps were also formed and secondary enamel knots (SEK) were present at their tips. Our results indicate clearly that we are able to regenerate teeth on the electrospun PCL membranes. This 3D nanofibrous membrane could be used as a support for tooth regeneration. After 10 days on our PCL membrane (Figure S1,E,F,G, Supporting Information), as well as on our control (Figure S1D, Supporting Information), elongated and polarized odontoblasts (Od) became functional with predentin/dentin secretion. At this stage, elongated but not functional ameloblasts (Am) are present (Figure S1, Supporting Information). Dental germ development occurs well on PCL membrane as on the usual semisolid medium.

To get more information concerning in vivo tooth regeneration on our implant, we followed the dental germs cultured for 6 days on semisolid medium (Figure 1A), as a control, or on our electrospun PCL membranes (Figure 1B,C,D) after subcutaneous implantation, near the ear of mice for two weeks. Our results indicate clearly that after two weeks implantation of the dental germ cultured on the electrospun PCL membranes, correct development of the crown occurs, with functional odontoblasts and ameloblasts (Figure 1B). Secretion of predentin/dentin and enamel occurred at this stage of the development. Elongated and polarized odontoblasts also secreted predentin/dentin (Figure 1D). At this stage, blood vessels were found in direct contact with odontoblasts, the development of the root was started normally, and the gradients of odontoblast differentiation were maintained in the root portion (Figure 1C). We report here the first demonstration that we are able to support not only in vitro but also in vivo tooth regeneration on the electrospun PCL membrane as a 3D support ready to use as an implant for tooth regeneration. Our results indicate clearly that we have good development of the tooth germ after implantation on a PCL membrane.

For more characterization of the induced tooth on this nanofiber membrane, the blood vessels in the dental pulp and in the periodontal tissue were stained with an anti-CD31 antibody (Figure 2A), while the odontoblasts and their extensions were stained with an anti-nestin antibody (Figures 2B) and the ameloblasts and enamel with an anti-amelogenin antibody (Figure 2C).

We are evidently able to regenerate the tooth by using the dental germ and the electrospun PCL membrane as a substrate. The tissues that developed as toothlike structures exhibited normal epithelial histogenesis and allowed the functional differentiation of odontoblasts and ameloblasts. After implantation, we detected not only a normal secretion of dentin and enamel formation but also root development. Based on these results, we report here the first demonstration of a unique hybrid material for tooth regeneration in vitro and in vivo. In Figure 2, our results indicate no innervation after implantation of the ED14 germs on unfunctionalized PCL membrane. We have also shown the same results by using functionalized membranes with bovine serum albumin (BSA) or NGF. These results could be explained by the fact that at this stage (ED14) of development, no axons could be detected.

We are also able to induce in vivo bone–tooth unit regeneration and revascularization (Figure S2, Supporting Information).^[36] However, no innervation of the regenerated tooth was detected with or without electrospun PCL membrane. To resolve this problem, a new strategy was engaged to obtain a fully physiological development of the tooth germ including innervation of the dental pulp.

Recently we have shown that we are able to electrospin PCL membranes. We are able to functionalize these electrospun PCL membranes by incorporation of BMP-2 as therapeutic agent.^[29] To induce innervation of the bioengineered tooth, we used the same strategy as before based on active nanoreservoirs of BMP-2^[29] to incorporate NGF as an active molecule. To show the effectiveness of our functionalization, we analyzed the electrospun membrane of PCL coated with nanoreservoirs by using scanning electron microscopy (SEM) and have shown that we were

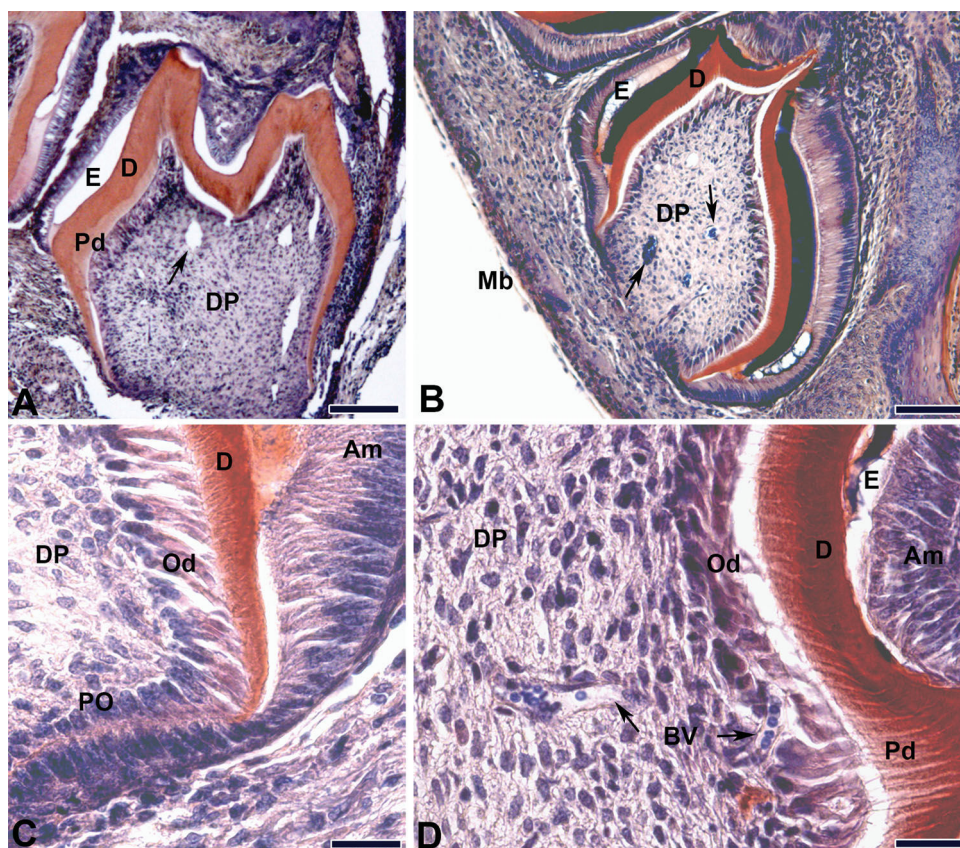


Figure 1. In vivo implantation for 2 weeks of ED14 first lower molars cultured 6 days on A) semisolid medium as a control or B–D) on electrospun PCL membranes. The black arrows indicate the blood vessels. Am: ameloblasts, BV: blood vessel, D: dentin, DP: dental pulp, E: enamel, Od: odontoblasts, Pd: predentin, PO: preodontoblasts. Scale bars: A,B = 100 μ m; C,D = 25 μ m.

able to incorporate NGF (Figure S3B, Supporting Information). In comparison, without coating, the electrospun fibers presented a smooth morphology (Figure S3A, Supporting Information).

To induce innervation of our bioengineered tooth, we used the trigeminal ganglion (TG) to supply neurons that physiologically innervate the tooth germ.^[38,39] First, we showed that TG could be cultivated onto PCL membranes with or without NGF. BSA was incorporated into the nanoreservoirs in place of NGF as a control. After 2 weeks of subcutaneous implantation

in mouse, no development of the axons (Ax), detected by an anti-peripherin antibody, of the TG into the control membrane without NGF (Figure 3A) was noted. In comparison, functionalization with NGF clearly improved the growth of axons from the TG into the active PCL membrane (Figure 3B,C). As a negative control we functionalized our membrane with BSA. After implantation in the presence of the dental germ (ED14) and the trigeminal ganglion (TG), no innervation was detected without NGF. However, when the membrane is functionalized

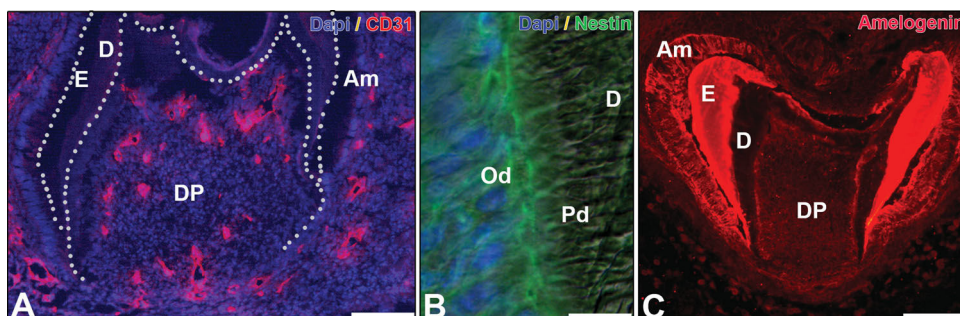


Figure 2. Immunofluorescence detection after 2 weeks implantation of ED14 first lower molars growing on the PCL membrane. A) Vascularization was detected with specific CD31 (red), B) odontoblasts were stained with nestin (green), and C) ameloblasts and enamel were detected by amelogenin (red). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; A, B, blue). Scale bars: A,C = 100 μ m; B = 25 μ m.

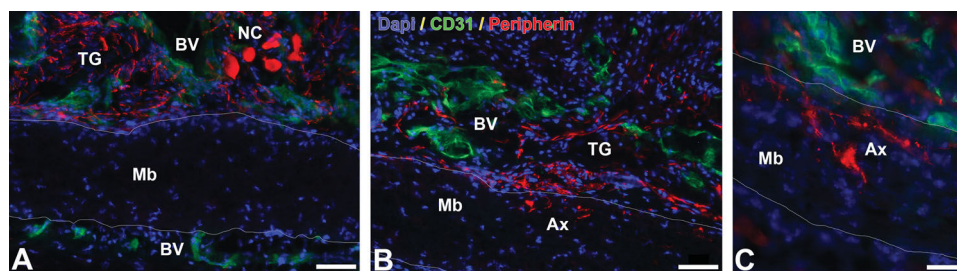


Figure 3. In vivo implantation for 2 weeks of trigeminal ganglia (TG) on electrospun PCL membranes functionalized with A) BSA as negative control, B) (DGL- G^4 /NGF) $_3$, and C) (DGL- G^4 /NGF) $_6$. Axons were stained with peripherin (red) blood vessels with CD31 (green) and nuclei with DAPI (blue). Axons (Ax) clearly penetrate into the PCL membrane functionalized with NGF (B,C) in contrast with the control membrane (A). NC: neural cells. Scale bars: A,B = 5 μ m; C = 25 μ m.

with NGF the innervation occurs. We have also shown that increasing the size of the nanoreservoirs (number of bilayers 3-6) (DGL- G^4 /NGF) $_3$ (Figure 3B) or (DGL- G^4 /NGF) $_6$ (Figure 3C) leads to an increased number of axons growing into the active membrane, which thereby shows the activity of our nanoreservoirs functionalized with NGF. Our results obviously indicate the capability of our nanoreservoirs with NGF to draw axons from the TG into the active PCL membrane.

To induce innervation of the bioengineered tooth, first lower molar tooth germs at ED14, associated with TG, were cultured overnight onto the control membrane without or with (DGL- G^4 /NGF) $_3$ nanoreservoirs and then implanted subcutaneously for 2 weeks. A satisfying vascularization but no innervation of the dental pulp (DP) was observed on our control membrane (Figure 4A). Without any active nanoreservoirs, underneath axons grew without innervation of the dental pulp (Figure 4A). Interestingly, with the active membrane (DGL- G^4 /NGF) $_3$, axon growth and full innervation of the tooth germ occurred (Figure 4B), indeed, axons even reached the odontoblastic layer. Furthermore, axons and blood vessels grew all together which leads to a physiologically vascularized and innervated tooth germ (Figure 4B). These results show clearly that a lot of axons penetrate into the dental pulp when TG are coimplanted with ED14 germs on a PCL membrane functionalized with NGF.

3. Conclusion

We have shown that it is possible to use an electrospun PCL membrane as a tooth germ substrate to regenerate teeth in vitro and in vivo. We have also shown that we are able to functionalize this electrospun membrane with active nanoreservoirs of NGF to promote the development of the TG that physiologically innervate the tooth germ, to bring neurons and its axons into the active membrane. After implantation of a tooth germ with a TG on our functionalized NGF membrane, we are able to induce a fully vascularized and innervated tooth.

With this strategy it should be possible to fabricate a combination cell-therapy implant capable of the regeneration of a vascularized and innervated tooth for tooth replacement regenerative therapy. We intend to develop this technology further to achieve the deposition of more active molecules such as BMP-2 to induce bone regeneration and finally bone-tooth unit regeneration. It will be also attractive to use cell electrospinning technology to encapsulate our dental germ and follow the tooth regeneration.^[34,35] We believe that our results make a significant contribution to the area of regenerative medicine. The concepts detailed here are applicable to a broad class of tissues and may aid in the design of sophisticated implants.

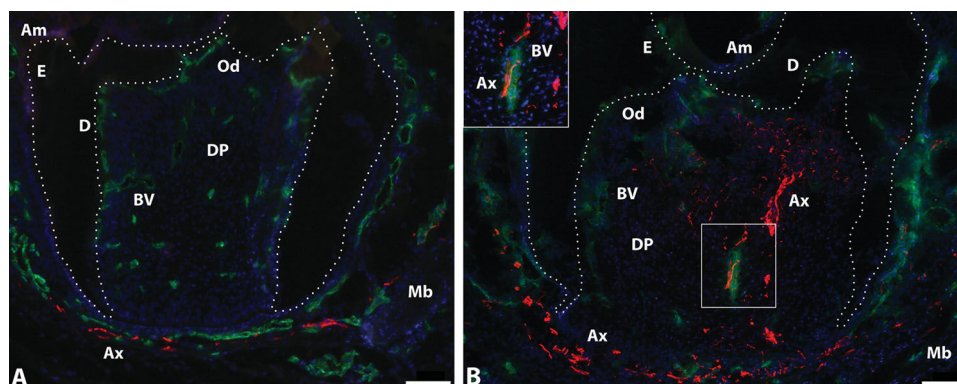


Figure 4. In vivo implantation for two weeks of TG and ED14 first lower molars on electrospun PCL membranes with A) (DGL- G^4 /BSA) $_3$ and B) active nanoreservoirs (DGL- G^4 /NGF) $_3$. Axons were stained with peripherin (red) blood vessels with CD31 (green) and nuclei with DAPI (blue). The insert in B shows the association between blood vessel and axon. Scale bars: 50 μ m.

4. Experimental Section

Chemicals: Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), analytical grade, was purchased from Sigma Aldrich. PCL was dissolved in a mixture of dichloromethane/dimethylformamide (DCM/DMF 50/50 vol/vol) at 25% wt/vol and was stirred overnight before use. Rat-tail type I collagen was purchased from Institut de Biotechnologies Jacques Boy. Dendri Graft poly-L-lysine of the fifth generation (DGL- G^4) was obtained from Colcom (Montpellier, France). Murine NGF was obtained from Sigma (USA). 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer and sodium chloride were obtained from Aldrich (St Louis, USA).

Electrospinning: A standard electrospinning set-up apparatus EC-DIG purchased from IME Technologies (Eindhoven, Netherlands) was used to fabricate the PCL nanofibrous membranes. The PCL solution was poured into a 5 mL syringe and ejected through a 21G needle of 0.8 mm diameter at a flow rate of 1.2 mL h⁻¹ using a programmable pump (ProSense). The experiments were performed with a high voltage of +23 kV set on the needle. The associated collector connected to the ground at a distance from the needle of 16 cm was used to collect the electrospun PCL scaffold. After 20 min of electrospinning, the scaffold was detached from the collector. The obtained electrospun nanofiber PCL 50- μ m thick scaffolds contain nanofibers with an average diameter of 517 ± 41 nm. The fibers were dried overnight at 45 °C, and cut into samples for a 24-well plate. After sterilization under UV for 30 min, the samples were incubated overnight in MES buffer before the construction of the nanoreservoirs. Fiber diameter measurement indicates that 68% of the fibers present a diameter under 500 nm. However a minority of the fibers (10%) have a diameter of over 1 μ m, which creates a slight bimodal distribution of the fiber diameter.

Buildup of the Nanoreservoirs: The DGL- G^4 solution was diluted to 50 μ g mL⁻¹ in 40 mM MES and 150 mM NaCl buffer, pH 5.5. The NGF solution was diluted to 600 ng mL⁻¹ in BSA at 1%. All wash baths were 40 mM MES and 150 mM NaCl solution buffer at pH 5.5. PCL scaffolds were functionalized by using the layer-by-layer method. The nanoreservoirs were fabricated according to the following protocol: The scaffolds were incubated in DGL- G^4 solution for 15 min, washed with the buffer solution for 15 min, and then incubated in NGF solution for 15 min and finally washed for 15 min, to construct a bilayer (DGL- G^4 /NGF) on the fiber surface. Repeating this protocol three or six times allowed the construction of (DGL- G^4 /NGF)₃ or (DGL- G^4 /NGF)₆ multilayered nanoreservoirs. The scaffolds were rinsed three times for 15 min with phosphate-buffered saline (PBS) and placed overnight at 4 °C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/F12: Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). The plates containing the scaffolds were prewarmed at 37 °C before cultivating the different tissues.

Molar ED14 culture: The first lower molars were dissected from ICR mouse (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) embryos at ED14. All procedures were in compliance with the recommendations of the European Economic Community (86/609/CEE) on use and care of laboratory animals. Molars were dissected and cultured for 6 d as previously described^[8,40] on semisolid medium for control.

Implant Preparation and In Vivo Implantation: After six days culture on electrospun PCL membrane (with BSA or NGF), ED14 germs (ED14 M1) were implanted between skin and muscles behind the ears in mice (eight weeks old ICR) for two weeks (2w). For the innervation experiment, molars were cultured for six days (6d) on semisolid medium, then associated with trigeminal ganglion (TG) dissected from postnatal day 3 mice (1/4 TG for one molar) on PCL membrane (functionalized by BSA or NGF) and incubated overnight before subcutaneous implantation for two weeks (Table 1).

Histological Preparation: Samples were fixed in Bouin-Hollande medium, embedded in paraffin, and 5 μ m serial sections were stained with Mallory solution. Implanted samples were demineralized in 4.3% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution for one week before embedding in paraffin.

Immunofluorescence Staining: Implants were embedded in Tissue-Tek and frozen at -20 °C. Sections (10 μ m) were stained with polyclonal rat anti-CD31 (1/100) (BD Pharmingen, Evry, France) for the detection

Table 1. Total number of implanted samples in each condition. Experiments were carried out in triplicate.

	ED14 M1 + 6d + 2w implantation	TG + 2w implantation	ED14 M1 + 6d + TG + 2w implantation
PCL membrane function- alized with BSA	10	3	15
PCL membrane function- alized with NGF	16	8	27

of vascular endothelial cells, polyclonal goat anti-nestin (1/200; Santa Cruz, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) for detection of odontoblasts and their extensions, polyclonal rabbit anti-amelogenin (1/200; Santa Cruz, Tebu-bio) for detection of ameloblasts and enamel, and polyclonal rabbit anti-peripherin (1/500; Abcam, Cambridge, UK) for axon detection. After washing with PBS, sections were incubated with secondary anti-rat or anti-rabbit antibodies conjugated to Alexa 594 (1/500) and anti-goat or anti-rat antibodies conjugated to Alexa 488 (1/200) (Molecular Probes, Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes, Invitrogen).

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

S.E., T.B., L.K., T.K., and F.F. contributed equally to this work. This work was supported by the project NanoOscar from the "Agence Nationale de la Recherche, ANR". N.J. is indebted to the "Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg" for financial support. N.J. is indebted to CHU de Nancy, Hôpital Central, "Chirurgie Orthopédique et Traumatologie" (Contrat d'interface INSERM vers l'hôpital). We are indebted to Hervé Gegout for his help and nice work on histology and Dr. Nadia Messadeq for her help with SEM analysis.

Received: July 11, 2013

Published online:

- [1] N. A. Peppas, R. Langer, *Science* **1994**, 263, 1715.
- [2] J. A. Hubbell, *Biotechnology* **1995**, 13, 565.
- [3] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, 428, 487.
- [4] C. Yang, P. J. Hillas, J. A. Baez, M. Nokelainen, J. Balan, J. Tang, R. Spiro, J. W. Polarek, *BioDrugs* **2004**, 18, 103.
- [5] L. G. Griffith, G. Naughton, *Science* **2002**, 295, 1009.
- [6] E. L. Chaikof, H. Matthew, J. Kohn, A. G. Mikos, G. D. Prestwich, C. M. Yip, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, 961, 96.
- [7] A. Nait Lechguer, M. L. Couble, N. Labert, S. Kuchler-Bopp, L. Keller, H. Magloire, F. Bleicher, H. Lesot, *J. Dent. Res.* **2011**, 90, 583.
- [8] A. Nait Lechguer, S. Kuchler-Bopp, B. Hu, Y. Haikel, H. Lesot, *J. Dent. Res.* **2008**, 87, 1138.
- [9] F. Oberpenning, J. Meng, J. J. Yoo, A. Atala, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 149.
- [10] K. I. Park, Y. D. Teng, E. Y. Snyder, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 1111.
- [11] .El-R. Kenawy, J. M. Layman, J. R. Watkins, G. L. Bowlin, J. A. Matthews, D. G. Simpson, G. E. Wnek, *Biomaterials* **2003**, 24, 907.
- [12] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1171.
- [13] D. M. Lynn, *Soft Matter* **2006**, 2, 269.

- [14] G. Decher, *Science* **1997**, 277, 1232.
- [15] N. Jessel, F. Atalar, P. Lavalle, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 692.
- [16] N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, F. Meyer, F. Audouin, B. Frisch, P. Schaaf, J. Ogier, G. Decher, J. C. Voegel, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1507.
- [17] N. Benkirane-Jessel, P. Schwinte, P. Falvey, R. Darcy, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Funct. Mater.* **2004**, 14, 174.
- [18] N. Jessel, M. Oulad-Abdelghani, F. Meyer, P. Lavalle, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 8618.
- [19] B. S. Kim, S. W. Park, P. T. Hammond, *ACS Nano* **2008**, 2, 386.
- [20] N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, E. Hubsch, V. Holl, B. Senger, Y. Haikel, J. C. Voegel, J. Ogier, P. Schaaf, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, 15, 648.
- [21] A. Dierich, E. Le Guen, N. Messaddeq, J.-F. Stoltz, P. Netter, P. Schaaf, J.-C. Voegel, N. Benkirane-Jessel, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 693.
- [22] S. Facca, C. Cortez, C. Mendoza-Palomares, N. Messaddeq, A. Dierich, A. P. R. Johnston, D. Mainard, J. C. Voegel, F. Caruso, N. Benkirane-Jessel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, 107, 3406.
- [23] K. C. Krogman, J. L. Lowery, N. S. Zacharia, G. C. Rutledge, P. T. Hammond, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 512.
- [24] F. Fioretti, C. Mendoza-Palomares, M. Helms, D. Al Alam, L. Richert, Y. Arntz, S. Rinckenbach, F. Garnier, Y. Haikel, S. C. Gangloff, N. Benkirane-Jessel, *ACS Nano* **2010**, 4, 3277.
- [25] A. Nadiri, S. Kuchler-Bopp, H. Mjahed, B. Hu, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, N. Benkirane-Jessel, *Small* **2007**, 3, 1577.
- [26] C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland, D. G. Simpson, G. L. Bowlin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59, 1413.
- [27] H. S. Yoo, T. G. Kim, T. G. Park, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, 61, 1033.
- [28] P. Taddei, A. Tinti, M. Reggiani, C. Fagnano, *J. Mol. Struct.* **2005**, 744, 135.
- [29] C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, S. Facca, F. Fioretti, G. Ladam, S. Kuchler-Bopp, T. Regnier, D. Mainard, N. Benkirane-Jessel, *ACS Nano* **2012**, 6, 483.
- [30] C. S. Young, S. Terada, J. P. Vacanti, M. Honda, J. D. Bartlett, P. C. Yelick, *J. Dent. Res.* **2002**, 81, 695.
- [31] C. S. Young, H. Abukawa, R. Asrican, M. Ravens, M. J. Troulis, L. B. Kaban, J. P. Vacanti, P. C. Yelick, *Tissue Eng.* **2005**, 11, 1599.
- [32] Y. Sumita, M. J. Honda, T. Ohara, S. Tsuchiya, H. Sagara, H. Kagami, M. Ueda, *Biomaterials* **2006**, 27, 3238.
- [33] W. Liu, S. Thomopoulos, Y. Xia, *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1, 10.
- [34] A. Townsend-Nicholson, S. N. Jayasinghe, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 3364.
- [35] D. Poncelet, P. de Vos, N. Suter, S. N. Jayasinghe, *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1, 26.
- [36] S. Kuchler-Bopp, T. Bécavin, T. Kökten, F. Fioretti, E. Deveau, N. Benkirane-Jessel, L. Keller, *Open J. Regen. Med.* **2013**, unpublished.
- [37] S. Sarram, K. F. Lee, M. R. Byers, *J. Comp. Neurol.* **1997**, 385, 297.
- [38] C. Lillesaar, C. Eriksson, C. S. Johansson, K. Fried, C. Hildebrand, *J. Neurocytol.* **1999**, 28, 663.
- [39] C. Lillesaar, K. Fried, *Neuroscience* **2004**, 125, 149.
- [40] B. Hu, A. Nadiri, S. Bopp-Kuchler, F. Perrin-Schmitt, H. Lesot, *J. Dent. Res.* **2005**, 84, 521.

Annexe 2

- Eap S, Keller L, Ferrand A, Schiavi J, Lahiri D, Lemoine S, Facca S, Fioretti F, Mainard D, Agarwal A & Benkirane-Jessel N (2014). Nanomechanical properties of active nanofibrous implants after in vivo bone regeneration. *Nano Life*. doi: 10.1142/S1793984414500019

Nanomechanical Properties of Active Nanofibrous Implants After *In Vivo* Bone Regeneration

S. Eap^{*,||}, L. Keller^{*,†,‡,||}, A. Ferrand^{*,||}, J. Schiavi^{*,||}, D. Lahiri^{‡,||},
S. Lemoine^{*,†}, S. Facca^{*}, F. Fioretti^{*,†}, D. Mainard[§],
A. Agarwal[‡] and N. Benkirane-Jessel^{*,†,§,¶}

**Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
UMR 1109 Jessel Laboratory, "Osteoarticular
and Dental Regenerative Nanomedicine"
Faculté de Médecine, Strasbourg, France*

*†Faculté de Chirurgie Dentaire
Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

*‡Plasma Forming Lab and Nanomechanics and Nanotribology Lab
Department of Mechanical and Materials Engineering
Florida International University, Miami FL 33174, USA*

*§Hôpital Central, Service de Chirurgie Orthopédique, Nancy, France
¶nadia.jessel@inserm.fr*

Received 10 May 2013

Accepted 12 September 2013

Published 28 November 2013

With the aging of the population and a correlated increase in the incidence of osteoarticular damage, great attention is focused on regenerative nanomedicine solutions to restore durable articular function and comfort. A durable cartilage repair is not effective without regeneration of an intact subchondral bed along with the surface chondral regeneration. Our expected outcomes are the development of clinical applications in the field of tissue engineering and nanomedicine, and more particularly in bone-cartilage unit regeneration. Here we report for the first time the nanomechanical analysis of the retrieved active implant after subchondral bone regeneration *in vivo*, which is much more efficient and long lasting solution to osteochondral defects than the existing ones. We believe that our results make a significant contribution to the area of regenerative nanomedicine. The concepts discovered here may serve to design sophisticated implants for placement into a broad variety of tissues.

Keywords: Bone regeneration; osteoblast; bone morphogenetic protein; poly (ϵ -caprolactone); nanoindentation; regenerative nanomedicine.

^{||}These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

With the aging of the population, huge attention is focused on tissue engineering solutions to restore durable bone function and comfort. This is considered a first target for regenerative medicine due to the nature of the tissues involved. The attractiveness of nanotechnology applications lies in the unique characteristics and phenomena that manifest due to their small size. Biomaterials play central roles in modern strategies in regenerative medicine and tissue engineering as designable biophysical and biochemical milieus that direct cellular behavior and function.

Recently, the development of advanced materials based on ECM analogues has become a major focus of applied research in regenerative medicine. Our objective is to propose a new strategy based on ECM synthetic materials to induce bone regeneration.^{1–7}

The intricate fibrillar architecture of natural ECM components has inspired several researchers to produce materials with similar structure. For fibers that are tens of microns in diameter, cells seem to respond as though to a 2D substrate, acquiring an unnatural flat shape, leading to a nonphysiological, asymmetrical occupation of adhesion receptors; notwithstanding, such matrices have already shown remarkable success in tissue engineering applications, such as in the reconstruction of a dog's urinary bladder⁸ or as scaffolds for neural stem cells to facilitate regeneration after brain injury in a mouse stroke model.⁹ Polymer processing technologies such as electrospinning¹⁰ allow fiber formation down to the 10-nm scale. In this study, we have used the polymer PCL (Poly (ϵ -caprolactone)) to create a membrane composed of electrospun nanofibers as a scaffold.

In recent years, considerable effort has been devoted to the design and controlled fabrication of structured matrices with functional properties.¹¹ Polyelectrolyte multilayer (PEM) films incorporating functional proteins and other bioactive materials provide one example.¹² PEM films are prepared by the layer-by-layer (LbL) deposition of interacting materials, typically by the electrostatic interaction of oppositely charged polyelectrolytes.¹³ Therapeutics and biomolecules including peptides, proteins and nucleic acid have been embedded in PEM films, which offer new opportunities for the preparation of functionalized bioactive coatings.^{12–14} These supramolecular nanoarchitectures can be designed to exhibit specific properties, including control of cell

activation, inflammation^{15,16} and localized drug, growth factor or nucleic acid delivery.^{17,18} Embedded active molecules, which are either chemically bound to polyelectrolytes or physically adsorbed, have been shown to retain their biological activity in many studies.^{15–22} Bioactive proteins can be directly integrated in the architecture without any covalent bonding with a polyelectrolyte and keep a secondary structure close to their native form. Degradable-layered structures appear, therefore, to be highly advantageous for progressive delivery of associated active agents.^{20–26} Our strategy for generating bone couples the use of an active nanofibrous membrane, as described, with cellularized hydrogels. In this study, we have used bone morphogenic protein 2 (BMP-2) as a growth factor to functionalize electrospun nanofibers of PCL. PCL is Food and Drug Administration (FDA) approved material that is used in the human body.

Recently, we have reported that by using PLL (Poly-L Lysine) or a Dendri-Graft of Lysine (DGL) to incorporate an active peptide into the multilayered film, we are not only able to modulate inflammation but also to increase the proliferation of cells in contact with this multilayered film.²⁶ We have also reported that the incorporation of BMP-2 into the multilayered DGL-BMP-2 films induces bone formation.²¹ In this study, we have chosen to use DGL and the active growth factor BMP-2 that stimulates bone induction (BMP-2 is already clinically approved for bone regeneration). The treatment goal for large bone defects should be to restore the physiological properties of bone. For successful regenerative nanomedicine, tissue-engineering strategies based on new hybrid implants become crucial. We report here the first nanomechanical properties of the retrieved active nanofibers implants for bone regeneration.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), analytical grade, was purchased from Sigma Aldrich. PCL was dissolved in a mixture of dichloromethane/dimethylformamide (DCM/DMF 50/50 vol/vol) at 15 wt/vol % and was stirred overnight before use. The Dendri Graft Poly-L-Lysines (DGLs) were purchased from COLCOM, Cap Alpha -Avenue de l'Europe — Clapiers, 34940 Montpellier Cedex 9. In this study, we have used the fifth-generation DGL^{G5}. Human recombinant

BMP-2 was purchased from PeproTech. Sodium alginate medium viscosity was from Sigma and hyaluronic acid (M.W. 132300) from Lifecore. Rat-tail type I collagen was purchased from Institut de Biotechnologies Jacques Boy.

2.2. Electrospinning

A homemade standard electrospinning setup was used to fabricate the PCL scaffolds. The PCL solution was poured into a 5 mL syringe and ejected through a needle with a diameter of 0.5 mm at a flow rate of 1.2 mL/h, thanks to a programmable pump (Harvard Apparatus). A high-voltage power supply (SPELLMAN, SL30P10) was used to set 15 kV at the needle. Aluminum foils ($20 \times 20 \text{ cm}^2$), connected to the ground at a distance from the needle of 17 cm, was used to collect the electrospun PCL scaffold.

2.3. Quartz cristal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D)

The QCM-D was operated with a D300 system (Q-Sense, Sweden) equipped with a QAFC302 flow chamber and QSX301 gold-coated quartz crystal sensors. This technique measures the resonance frequency shifts Δf and the dissipation factor changes ΔD of the quartz crystal sensor upon material deposition. The LbL buildup was performed by successive injections of polyelectrolyte or protein solutions (300 mL, with rest periods of 6 min) and rinsing buffer solution (500 mL, with rest periods of 6 min) through the flow chamber, and monitored *in situ*. Changes in the resonance frequencies were measured at the 3rd, 5th and 7th overtones ($\nu = 3, 5$ and 7) corresponding to the 15-MHz, 25-MHz and 35-MHz resonance frequencies. A shift in $f\nu$ can be associated, in a first approximation, to a variation of the mass adsorbed onto the crystal through the Sauerbrey relation: $m = -C'_{f\nu}/\nu$, where C' is a constant characteristic of the crystal used ($C' = 17.7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$). Mean thicknesses of the equivalent uniform film were derived from mass values assuming a film density of 1.1 g cm^{-3} .

2.4. Polyelectrolyte multilayered film preparation

For all biological activity experiments, PEM films were prepared on electrospun PCL membrane. A

film constituted by $(\text{DGL}^{\text{G5}}\text{-BMP-2})_n$ was built by alternating immersion of the surfaces for 15 min in the respective solution (300 μL) at the respective concentrations of 50 $\mu\text{g/mL}$ for DGL^{G5} and 200 ng/mL of BMP-2 in the presence of 0.04 M MES and 0.15 M NaCl at pH 5.5. After each deposition step, the membranes were rinsed for 15 min with 0.04 M MES and 0.15 M NaCl at pH = 5.5. All the films were sterilized for 30 min by exposure to ultraviolet (UV) light (254 nm, 30 W, illumination distance 20 cm). Before use, all membranes were equilibrated in contact with 1 mL of serum-free medium (see cell culture).

2.5. Cell culture

Human primary osteoblasts were obtained from Cell Applications and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM®) containing 50 U/mL penicillin, 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ Amphotericin B and 10% FBS (Life Technologies, Paisley, UK). The cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . When the cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured.

2.6. Implant preparation

About 5×10^4 human osteoblasts were seeded and incubated for 72 h prior to gel preparation. For the collagen lattices preparation, 3 mL of Rat Tail Type-I Collagen (Institut de Biotechnologies Jacques Boy) were mixed with 5.5 mL of medium containing 10% FBS, 0.5 mL of a 0.1 M NaOH solution and 1 mL of cell suspension at 2×10^5 cells/mL. Approximately 0.5 mL of the cells suspension: collagen preparation were poured on the top of the electrospun membrane and allowed to polymerize by incubating it at 37°C for 30 min. A total of 5-mm cylinders were cut using a sterile biopsy punch and incubated *o/n* at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 prior the *in vivo* experiments (calvaria implantation).

2.7. In vivo implantation

In vivo implantation on the skull of NMRI-nude mice: the surgical procedure involved removal of hair over the head via shaving and cleaning. The mice were anesthetized with isoflurane gas and animals were placed on ventral decubitus on heating table,

with strict aseptic conditions after skin incision, one bony defect was performed using an electrical drill with a sterile round bur under irrigation of sterile normal saline before deposition of the membrane and sutures with Ethicon® 9/0. The skin was closed with sutures and the animal's behavior was observed after waking up. For all *in vivo* studies, animals were acclimatized for a minimum of two weeks prior to the experimentation. All procedures were performed with prior ethical approval and carried out in accordance with the regulations laid down for the animals. Accreditation number of investigator is "Préfecture Bas-Rhin (France): 67-315".

2.8. Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% PFA for 1 h, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 h and incubated for 20 min with Alexa Fluor 546-conjugated phalloidin (Molecular Probes) for F-actin labeling and 5 min with 200 nM DAPI (Sigma) for nuclear staining. Cells were mounted on microscope slides using Vectashield (Vector) and imaged by confocal microscopy (Zeiss, LSM 510).

2.9. *In vitro* examination of mineralization using fluorescent dyes

Xylenol orange powder (Sigma) is dissolved in distilled water to make the 20 mM stock solution. Xylenol orange was added to medium overnight to a final concentration of 20 μ M. Before the microscopic examination, the samples were rinsed with fresh medium without fluorochrome to avoid nonspecific fluorescence. Xylenol orange expresses a red color under the fluorescent microscope (LEICA DM 4000 B).

2.10. Nanoindentation

Elastic modulus and hardness of bones and different membranes in the retrieved implants was evaluated using nanoindentation. The retrieved implants (membranes attached on the bone skull), were cleaned by removing the attached tissues. The tests were carried out on the samples hydrated in formalin.²⁷ In order to prepare the sample surface for nanoindentation experiments, implants were gently polished using wet cloth without any

abrasive particles. Hysitron Triboindenter TI 900 with a Berkovich probe of 100-nm radius was used for the indentations. A displacement-controlled indentation cycle was applied with a maximum displacement 100 nm at the loading/unloading rate of 10 nm/s. A dwell of 3 s was included at the maximum displacement. A total of 10–15 indents were performed on each sample. Oliver and Pharr method was used to compute the elastic modulus.²⁸

3. Results and Discussion

3.1. Bone matrix synthesis

To analyze the incorporation of BMP-2 into the multilayered films (DGL^{G5}-BMP-2)_n, the buildup was followed by Quartz micro balance (QCM-D) and a linear increase of thickness was shown after each deposition.²² The buildup of the nanoreservoirs embedding BMP-2 was followed, revealing linear growth in the wet adsorbed mass and hydrodynamic thickness, and confirming the nanometric scale of the nanoreservoirs. Each BMP-2 injection step resulted in the immobilization of about 180 ng cm⁻² BMP-2 up to the NR3 architecture, and about 330 ng cm⁻² in further steps.²²

To evaluate the potential of the scaffolds to promote cell differentiation, the *in vitro* gene expression (Osteopontin, OPN and Bone Sialoprotein 2, BSP2) by primary human osteoblasts was inspected by immunochemistry after 7 days and 14 days of culture (see Figs. 1 and 2). These genes' expression were clearly promoted in the presence of BMP-2, with a best promoting effect for cells cultured onto the scaffolds equipped with DGL-based BMP-2 nanoreservoirs. As a negative control, we have also treated PCL scaffolds with (DGL/BSA)₃ architectures using the inert protein BSA instead of BMP-2. We verified the total absence of these genes expression by osteoblastic cells cultured onto these scaffolds.

By using the Xylenol Orange, we have also analyzed the presence of mineralized nodules in living human osteoblastic culture *in vitro* after 16 days with these active implants functionalized by BMP-2 (see Fig. 3).

Our results indicated evidently here that we have an increase of the mineralization speed by incorporation of the active BMP-2 into the DGL nanoreservoirs as a coating of the PCL nanofibers.

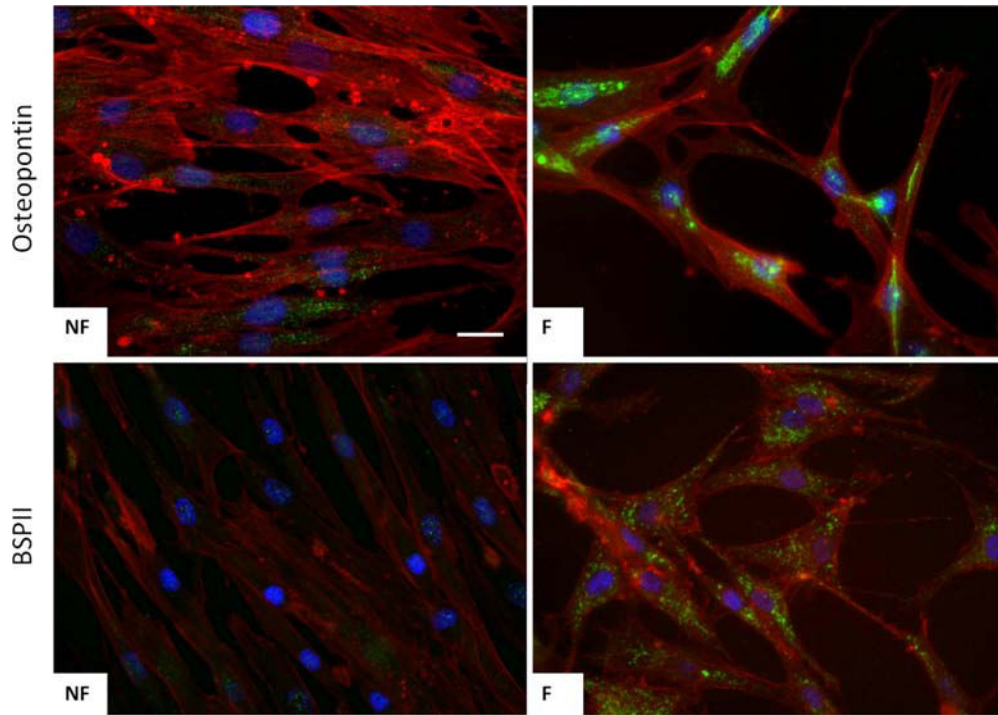


Fig. 1. Osteopontin or BSP-II expressions in human osteoblasts (after 7 days) growing on the surface of the implant (PCL nanofibers) without BMP-2 (NF) and functionalized by $(DGL^{G5}\text{-BMP-2})_3$ nanoreservoirs (F). (Osteopontin expression in green, phalloidin staining for actin cytoskeleton in red and DAPI staining for the nucleus in blue), scale bar: $20\ \mu\text{m}$.

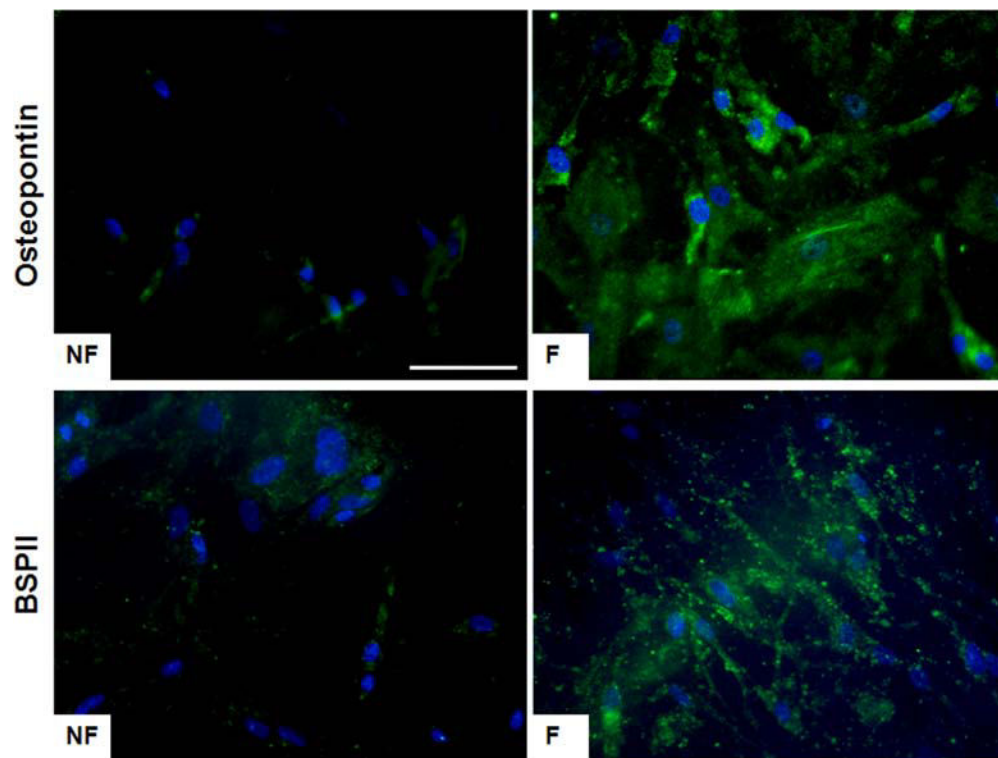


Fig. 2. Osteopontin or BSP-II expressions in human osteoblasts (after 14 days) growing on the surface of the implant (PCL nanofibers) without BMP-2 (NF) and functionalized by $(DGL^{G5}\text{-BMP-2})_3$ nanoreservoirs (F). (Osteopontin expression in green and DAPI staining for the nucleus in blue), scale bar: $70\ \mu\text{m}$.

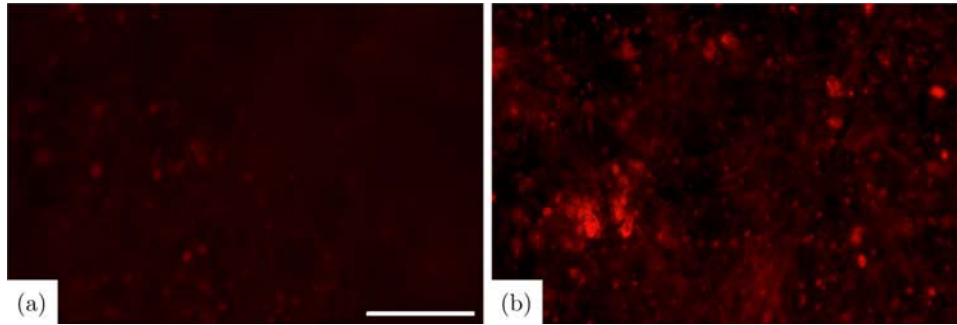


Fig. 3. Detection of mineralized nodules (after 16 days) in human osteoblasts growing on the surface of the implant without BMP-2 (a) and functionalized by BMP-2: (DGL^{G5}-BMP-2)₃ nanoreservoirs (b), scale bar: 70 μm.

3.2. *In vivo* implantations and nanomechanical properties of the nanofibers

After the *in vitro* characterization, we have analyzed the *in vivo* capability of different implants to induce bone or bone unit regeneration. The *in vivo* implantations were achieved on Nude mice skull (see Fig. 4). The surgical procedure involved a bony defect performed using an electrical drill with a sterile round bur under irrigation of sterile normal saline and then deposition of the implant. The skin was closed with nonabsorbable sutures.

In this study, four types of implants were analyzed (see Fig. 5):

- Implant NF: Control PCL electrospun nanofibers membrane without coating
- Implant A: PCL electrospun nanofibers membrane + h Osteoblasts

- Implant B: PCL electrospun nanofibers membrane/BMP-2 + h Osteoblasts
- Implant C: PCL electrospun nanofibers membrane/BMP-2 + mixed-Collagen/h Osteoblasts

As a control sample, we have analyzed normal bone.

Our manufactured implants could be used for small lesions of bone without any need to add cells from patients. Unfortunately, for large and deep lesions it becomes necessary to add osteoblasts from the patient. In the clinic today, surgeons use collagen membranes (animal origin) that slowly induce bone formation and cannot be used for all types of lesion. In this study, we have deposited a mixed collagen matrix and human osteoblasts on the membrane (Implant C) and have shown bone induction. We have also analyzed the nanomechanical properties of the retrieved implants (see Fig. 6). As a control, we have first analyzed the elastic modulus and hardness of the bone near the membrane NF

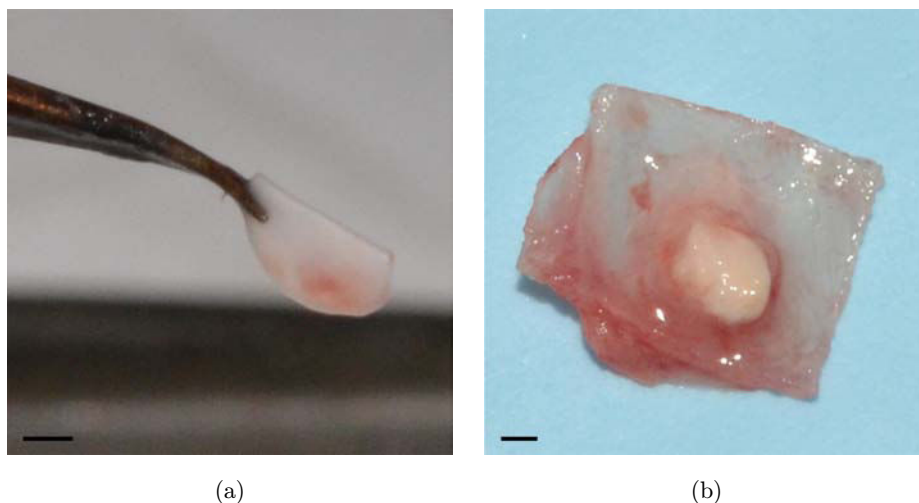


Fig. 4. *In vivo* implantation (Nude mice skull); (a) Active nanofibrous implant (implant size around 5 mm diameter and 50 μm thickness); (b) Retrieved implant (membranes attached on bone skull mice) after 2 months implantation, scale bars: 2 mm.

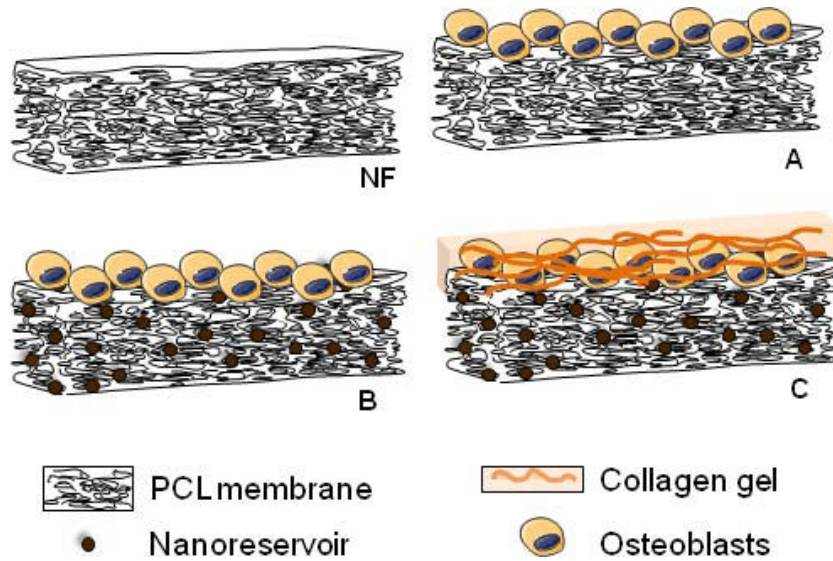


Fig. 5. Schematic representation of different implants, used in this study, functionalized or not by active nanoreservoirs of BMP-2.

(control). We have shown that this bone has an elastic modulus (6.39 ± 2.06 GPa) and hardness (0.29 ± 0.05 GPa) quite similar to the normal bone (6.13 ± 0.43 GPa) and (0.33 ± 0.03 GPa) (data not shown).

Figure 6 shows the comparison of elastic modulus and hardness for each implant. Figure 6 shows that the elastic modulus on implant B (2.19 ± 0.39 GPa) is slightly increased in comparison with the implant A (1.74 ± 0.65 GPa). These results could be explained by the positive effect of the incorporation of BMP-2 as a coating of the nanofibers membrane (implant B). Interestingly, the highest value of elastic modulus was measured on membrane C (14.26 ± 2.16 GPa). In this case, we have not only the active nanoreservoirs of BMP-2 like on the

implant B but also a mixed collagen and human osteoblasts. This implant induces more bone formation and could be used for large bone lesions. We have also shown the same results in hardness in correlation with the elastic modulus (see Fig. 6). Our results indicate clearly that the highest value of elastic modulus was measured on the implant C (a mix of collagen and osteoblasts) in accordance with more bone induction. The elastic modulus of the implant B (without collagen) was 2.19 ± 0.39 GPa. We have also analyzed the representative loads versus displacement plots. The load–displacement curves with well-defined unloading portion provide confidence about the elastic modulus values.

The modulus and hardness values of normal mice bone could be different because of different factors

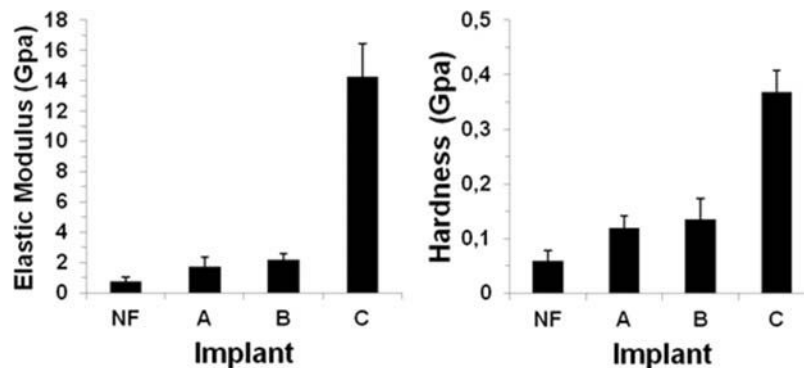


Fig. 6. Bar charts showing elastic modulus and hardness of implant NF (Control PCL membrane without coating), implant A (PCL Membrane + h Osteoblasts), implant B (PCL membrane/BMP-2+h Osteoblasts), implant C (PCL membrane/BMP-2+mixed-Collagen/h Osteoblasts). See Fig. 5.

such as age of mice,^{29,30} or localized area of skull chondracranium or calvarium, where indentation was made.³⁰ In this study, after comparison of different bones near implanted membranes, we have shown that values of elastic modulus and hardness were increased when implants (B and C) have a drug delivery system (bone growth factor, BMP-2) incorporated into the nanoreservoirs as a coating of the nanofibers. The skeleton and the skull of mice are still growing not yet mineralized, because of their age (16-weeks old). BMP-2 induces a chemical stimulus on the cortical bone growth near the implants.²⁹ Both mineral apposition and bone formation around membranes (B and C) are accelerated because of local effect of BMP-2, which is influencing bone's properties.³¹ Concerning the membranes, the control membrane (implant NF) shows the lowest values of elastic modulus and hardness due to soft fibrous tissue. Progressive additions of bone cells on implant NF, of BMP-2 on membrane A and as far, of collagen on membrane B has increased elastic modulus, because of the bone induction. Induction of a mineralized bone formation is obtained on membrane C.

Complementary histological data after one-month implantation in mouse calvaria were collected for the most promising, DGL/BMP-2 treated membrane. Mallory trichrome coloration was used in order to distinguish between cell nuclei, extracellular matrix and mineralized zones (see Fig. 7). The figure shows that the scaffold was colonized by the host cells with strong evidence of osseointegration and new bone mineralization.

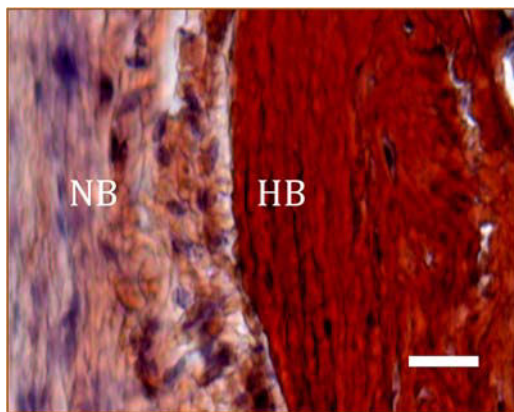


Fig. 7. Histological study by Mallory trichrome staining of DGL-BMP-2 treated scaffolds after 1-month implantation in mouse calvaria. Scale bars: 50 μ m. HB: Host bone and NB: New bone regenerated.

4. Conclusions

We report here the nanomechanical properties of the retrieved active nanofibers implants for bone regeneration. These promising results point to potentially far more efficient surgical approaches that are currently available.

Acknowledgments

This work was supported by the project NanoOSCAR, Neotissage and Fibrotaxane from the "Agence Nationale de la Recherche, ANR", N. J thank the Faculté de Chirurgie Dentaire and SATT Conectus of Strasbourg for financial support. N. J is indebted to CHU de Nancy, Hôpital Central, "Chirurgie Orthopédique et Traumatologie" (Contrat d'interface INSERM vers l'hôpital). We are indebted to Hervé Gegout for his help and nice work on histology. A. A acknowledges the support from the National Science Foundation CAREER Award (NSF-DMI-0547178) and DURIP award from Office of Naval Research (N00014-06-0675).

References

1. N. A. Peppas and R. Langer, *Science* **263**, 1715 (1994).
2. J. A. Hubbell, *Bio/Technology* **13**, 565 (1995).
3. R. Langer and D. A. Tirrell, *Nature* **428**, 487 (2004).
4. C. Yang, P. J. Hillas, J. A. Baez *et al.*, *BioDrugs* **18**, 103 (2004).
5. L. G. Griffith and G. Naughton, *Science* **295**, 1009 (2002).
6. T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane and R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **6**, 13 (2011).
7. B. Thierry and M. Textor, *Biointerphases* **7**, 1 (2012).
8. F. Oberpenning, J. Meng, J. J. Yoo and A. Atala, *Nat. Biotechnol.* **17**, 149 (1999).
9. K. I. Park, Y. D. Teng and E. Y. Snyder, *Nat. Biotechnol.* **20**, 1111 (2002).
10. E. R. Kenawy, J. M. Layman, J. R. Watkins *et al.*, *Biomaterials* **24**, 907 (2003).
11. S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **21**, 1171 (2003).
12. D. M. Lynn, *Soft Matter* **2**, 269 (2006).
13. G. Decher, *Science* **277**, 1232 (1997).
14. N. Jessel, F. Atalar, P. Lavalle *et al.*, *Adv. Mater.* **15**, 692 (2003).
15. N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, F. Meyer *et al.*, *Adv. Mater.* **16**, 1507 (2004).
16. N. Benkirane-Jessel, P. Schwinté, P. Falvey *et al.*, *Adv. Funct. Mater.* **14**, 174 (2004).
17. N. Jessel, M. Oulad-Abdelghani, F. Meyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8618 (2006).

18. B. S. Kim, S. W. Park and P. T. Hammond, *ACS Nano* **2**, 386 (2008).
19. N. Benkirane-Jessel, P. Lavalley, E. Hübsch *et al.*, *Adv. Funct. Mater.* **15**, 648 (2005).
20. A. Dierich, E. Le Guen, N. Messaddeq *et al.*, *Adv. Mater.* **19**, 693 (2007).
21. S. Facca, C. Cortez, C. Mendoza-Palomares *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 3406 (2010).
22. C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, S. Facca *et al.*, *ACS Nano* **6**, 483 (2012).
23. K. C. Krogman, J. L. Lowery, N. S. Zacharia, G. C. Rutledge and P. T. Hammond, *Nat. Mater.* **8**, 512 (2009).
24. C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland, D. G. Simpson and G. L. Bowlin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1413 (2007).
25. H. S. Yoo, T. G. Kim and T. G. Park, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 1033 (2009).
26. F. Fioretti, C. Mendoza-Palomares, M. Helms *et al.*, *ACS Nano* **4**, 3277 (2010).
27. S. Pathak, J. Gregory Swadener, S. R. Kalidindi, H. W. Courtland, K. J. Jepsen and H. M. Goldman, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **4**, 34 (2011).
28. W. C. Oliver and G. M. Pharr, *J. Mater. Res.* **7**, 1564 (1992).
29. M. J. Silva, M. D. Brodt, Z. Fan and J. Y. Rho, *J. Biomech.* **37**, 1639 (2004).
30. M. P. Akhter, J. K. Otero, U. T. Iwaniec, D. M. Cullen, G. R. Haynatzki and R. R. Recker, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **4**, 33 (2004).
31. M. Macholan, *Zoologischer Anzeiger* **247**, 315 (2008).

VII. RÉFÉRENCES

- Ahirwal D, Hébraud A, Kadar R, Wilhelm M, Schlatter G (2013). From self-assembly of electrospun nanofibers to 3D cm thick hierarchical foams. *Soft Matter* 9(11) :3164-3172
- Akali A, Huck O, Buduneli N, Davideau JL, Kose T, Tenenbaum H (2014). Exposure of *Porphyromonas gingivalis* to cortisol increases bacterial growth. *Archives of oral biology* 59(1):30-34.
- Albrektsson T, Johansson C (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 10 Suppl 2 :S96-101.
- Anas E-A (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release* 94(1):1-14.
- Anderson HC (1995). Molecular biology of matrix vesicles. *Clinical orthopaedics and related research* (314):266-280.
- Bajek A, Czerwinski M, Olkowska J, Gurtowska N, Kloskowski T, Drewa T (2012). Does aging of mesenchymal stem cells limit their potential application in clinical practice? *Aging clinical and experimental research* 24(5):404-411.
- Bandyopadhyay B, Shah V, Soram M, Viswanathan C, Ghosh D (2013). In vitro and in vivo evaluation of (L)-lactide/epsilon-caprolactone copolymer scaffold to support myoblast growth and differentiation. *Biotechnology Progress* 29(1):197-205.
- Baron R (1995). Molecular mechanisms of bone resorption. An update. *Acta orthopaedica Scandinavica Supplementum* 266 :66-70.
- Beertsen W, Van den Bos T (1992). Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *The Journal of clinical investigation* 89(6):1974-1980.
- Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA (2008). Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University* 96(1):1-11.
- Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G (2006). Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *The Cochrane database of systematic reviews* 2:CD005321.
- Benkirane-Jessel N, Lavallo P, Meyer F, Audouin F, Frisch B, Schaaf P *et al.* (2004a). Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents. *Advanced Materials* 16(17):1507-1511.
- Benkirane-Jessel N, Schwinte P, Falvey P, Darcy R, Haikel Y, Schaaf P *et al.* (2004b). Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Advanced Functional Materials* 14(2):174-182.

- Benkirane-Jessel N, Lavalley P, Hubsch E, Holl V, Senger B, Haikel Y *et al.* (2005). Short-time tuning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers. *Advanced Functional Materials* 15(4):648-654.
- Bercy P, Tenenbaum H (1996). Le parodonte sain et ses modifications histopathologiques. In: Parodontologie Du diagnostique à la pratique. D BOECK editor.
- Berth G, Voigt A, Dautzenberg H, Donath E, Mohwald H (2002). Polyelectrolyte complexes and layer-by-layer capsules from chitosan/chitosan sulfate. *Biomacromolecules* 3(3):579-590.
- Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2 :403-430.
- Bianco P, Robey PG (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414(6859):118-121.
- Bocanegra-Perez S, Vicente-Barrero M, Knezevic M, Castellano-Navarro JM, Rodriguez-Bocanegra E, Rodriguez-Millares J *et al.* (2012). Use of platelet-rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 41(11):1410-1415.
- Boivin G (1988). Système ostéo-articulaire: Inserm.
- Bolgen N, Menciloglu YZ, Acatay K, Vargel I, Piskin E (2005). In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(epsilon-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 16(12):1537-1555.
- Bottino MC, Jose MV, Thomas V, Dean DR, Janowski GM (2009). Freeze-dried acellular dermal matrix graft: effects of rehydration on physical, chemical, and mechanical properties. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 25(9):1109-1115.
- Bottino MC, Thomas V, Jose MV, Dean DR, Janowski GM (2010). Acellular dermal matrix graft: synergistic effect of rehydration and natural crosslinking on mechanical properties. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 95(2):276-282.
- Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ *et al.* (2012). Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 28(7):703-721.
- Bottlang M, Doornink J, Lujan TJ, Fitzpatrick DC, Marsh JL, Augat P *et al.* (2010). Effects of construct stiffness on healing of fractures stabilized with locking plates. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 92 Suppl 2 :12-22.
- Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH (2006). Electrospinning approaches toward scaffold engineering - A brief overview. *Artificial Organs* 30(10):785-792.

- Bouquot JE, Christian J (1995). Long-term effects of jawbone curettage on the pain of facial neuralgia. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 53(4):387-397.
- Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C (2007). Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. *Journal of periodontal research* 42(3):219-227.
- Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A (2007). Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22(3):465-475.
- Cai K, Rechtenbach A, Hao J, Bossert Jr, Jandt KD (2005). Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials* 26(30):5960-5971.
- Cakarar S, Selvi F, Isler SC, Keskin C (2011). Decompression, enucleation, and implant placement in the management of a large dentigerous cyst. *The Journal of craniofacial surgery* 22(3):922-924.
- Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G *et al.* (2014). Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of materials science Materials in medicine*.
- Cao W, Hench LL (1996). Bioactive materials. *Ceramics International* 22(6):493-507.
- Caplan AL, Haynesworth SE inventors (1993). Method for enhancing the implantation and differentiation of marrow-derived MSC. USA patent.
- Carlson ER, Basile JD (2009). The role of surgical resection in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 67(5 Suppl):85-95.
- Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM (2007). Nanotechnological applications in medicine. *Current opinion in biotechnology* 18(1):26-30.
- Catledge SA, Clem WC, Shrikishen N, Chowdhury S, Stanishevsky AV, Koopman M *et al.* (2007). An electrospun triphasic nanofibrous scaffold for bone tissue engineering. *Biomedical Materials* 2(2):142-150.
- Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J (2010). Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells International* 2010:215625.
- Chen FM, Jin Y (2010). Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Engineering Part B Review* 16(2):219-255.
- Chen VJ, Ma PX (2004). Nano-fibrous poly(-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials* 25(11):2065-2073.

Chiron P BA (2013). Consolidation osseuse, adaptation de l'os aux contraintes, aspects fondamentaux.

Chluba J, Voegel J-C, Decher G, Erbacher P, Schaaf P, Ogier J (2001). Peptide Hormone Covalently Bound to Polyelectrolytes and Embedded into Multilayer Architectures Conserving Full Biological Activity. *Biomacromolecules* 2(3):800-805.

Choi JH, Park YW, Park TH, Song EH, Lee HJ, Kim H *et al.* (2012). Fuzzy Nanoassembly of Polyelectrolyte and Layered Clay Multicomposite toward a Reliable Gas Barrier. *Langmuir* 28(17):6826-6831.

Choi JS, Leong KW, Yoo HS (2008a). In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials* 29(5):587-596.

Choi WS, Bae JW, Lim HR, Joung YK, Park JC, Kwon IK *et al.* (2008b). RGD peptide-immobilized electrospun matrix of polyurethane for enhanced endothelial cell affinity. *Biomedical Materials* 3(4):044104.

Chua P-H, Neoh K-G, Kang E-T, Wang W (2008). Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials* 29(10):1412-1421.

Cipitria A, Skelton A, Dargaville TR, Dalton PD, Hutmacher DW (2011). Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds-a review. *Journal of Materials Chemistry* 21(26):9419-9453.

Columbus S, Krishnan LK, Kalliyana Krishnan V (2014). Relating pore size variation of poly (epsilon-caprolactone) scaffolds to molecular weight of porogen and evaluation of scaffold properties after degradation. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 102(4):789-796.

Compston JE, Papapoulos SE, Blanchard F (1998). Report on osteoporosis in the European Community: current status and recommendations for the future. Working Party from European Union Member States. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 8(6):531-534.

Cooper C, Campion G, Melton LJ, 3rd (1992). Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2(6):285-289.

Curran D, Maravic M, Kiefer P, Tochon V, Fardellone P (2010). Epidemiology of osteoporosis-related fractures in France: a literature review. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 77(6):546-551.

- Daubine F, Cortial D, Ladam G, Atmani H, Haikel Y, Voegel JC *et al.* (2009). Nanostructured polyelectrolyte multilayer drug delivery systems for bone metastasis prevention. *Biomaterials* 30(31):6367-6373.
- Decher G (1997). Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277(5330):1232-1237.
- Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE (2014). Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clinical Oral Implants Research*.
- Demmer RT, Papapanou PN (2010). Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* 53 :28-44.
- Dempster DW (2011). Osteoporosis and the burden of osteoporosis-related fractures. *The American journal of managed care* 17 Suppl 6 :S164-169.
- Deng H, Zhou X, Wang X, Zhang C, Ding B, Zhang Q *et al.* (2011). Layer-by-layer structured polysaccharides film-coated cellulose nanofibrous mats for cell culture. *Carbohydrate Polymers* 80(2):474-479.
- Denhardt DT, Guo X (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7(15):1475-1482.
- Depalle B (2011). Influence de l'hétérogénéité des propriétés mécaniques sur la résistance de l'os trabéculaire humain, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Develioglul H, Unver Saraydin S, Kartal U (2009). The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dental materials journal* 28(4):396-400.
- Dierich A, Le Guen E, Messaddeq N, Stoltz J-F, Netter P, Schaaf P *et al.* (2007). Bone formation mediated by synergy-acting growth factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film *Advanced Materials* 19(5):693-697.
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine* 9:66.
- Ding F, Deng H, Du Y, Shi X, Wang Q (2014). Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale* 6(16) :9477-9493.
- Dori F, Huszar T, Nikolidakis D, Arweiler NB, Gera I, Sculean A (2007). Effect of platelet-rich plasma on the healing of intra-bony defects treated with a natural bone mineral and a collagen membrane. *Journal of clinical periodontology* 34(3):254-261.
- Doshi J, Reneker DH (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of electrostatics* 35 :151-160.

- Dubas ST, Kittitheeranun P, Rangkupan R, Sanchavanakit N, Potiyaraj P (2009). Coating of polyelectrolyte multilayer thin films on nanofibrous scaffolds to improve cell adhesion. *Journal of Applied Polymer Science* 114(3):1574-1579.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C *et al.* (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382(6590):448-452.
- Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R (2011). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol* 6(1):13-22.
- Efthymiou AG, Chen G, Rao M, Chen G, Boehm M (2014). Self-renewal and cell lineage differentiation strategies in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Expert opinion on biological therapy* 31:1-12.
- El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V (2014). Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies? *Tissue Eng Part B Rev* 1(38) :161-169.
- Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J (2005). Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 106(13):4057-4065.
- Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C, Messadeq N, Dierich A, Johnston APR *et al.* (2009). Active multilayered capsules for in vivo bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(8):3406-3411.
- Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C, Messadeq N, Dierich A, Johnston APR *et al.* (2010). Active multilayered capsules for in vivo bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(8):3406-3411.
- Fakhari A, Berkland C (2013). Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomaterialia* 9(7):7081-7092.
- Fioretti F, Mendoza-Palomares C, Helms M, Al Alam D, Richert L, Arntz Y *et al.* (2010). Nanostructured assemblies for dental application. *ACS Nano* 4(6):3277-3287.
- Florian A, Cohn LH, Dammin GJ, Collins JJ, Jr. (1976). Small vessel replacement with gore-tex (expanded polytetrafluoroethylene). *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 111(3):267-270.
- Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology* 16(3):381-390.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6(2):230-247.
- Fujihara K, Kotaki M, Ramakrishna S (2005). Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials* 26(19):4139-4147.

- Galois L, Freyria AM, Grossin L, Hubert P, Mainard D, Herbage D *et al.* (2004). Cartilage repair: surgical techniques and tissue engineering using polysaccharide- and collagen-based biomaterials. *Biorheology* 41(3-4):433-443.
- Galois L, Freyria AM, Herbage D, Mainard D (2005). [Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches]. *Pathologie-biologie* 53(10):590-598.
- Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G (2011). Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J* 6(10):1187-1197.
- Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Balasubramanian P, Jin G, Valipouri A, Ramakrishna S (2013). Advances in electrospun nanofibers for bone and cartilage regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 13(7):4656-4671.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005). Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3(S20-27).
- Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R (2011). Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury* 42(6):591-598.
- Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Paans AM, Ruben JL, Raghoobar GM *et al.* (2008). The influence of barrier membranes on autologous bone grafts. *Journal of Dental Research* 87(11):1048-1052.
- Girones Molera J, Mendez JA, San Roman J (2012). Bioresorbable and nonresorbable polymers for bone tissue engineering. *Current pharmaceutical design* 18(18):2536-2557.
- Gonzalvez-Garcia M, Rodriguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodriguez-Gonzalez MA, Onate-Sanchez R *et al.* (2012). Mesenchymal stem cells and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the future? *Oral diseases* 18(8):823-824.
- Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J *et al.* (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336):63-67.
- Gray FL, Turner CG, Ahmed A, Calvert CE, Zurakowski D, Fauza DO (2012). Prenatal tracheal reconstruction with a hybrid amniotic mesenchymal stem cells-engineered construct derived from decellularized airway. *Journal of pediatric surgery* 47(6):1072-1079.
- Gullberg B, Johnell O, Kanis JA (1997). World-wide projections for hip fracture. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 7(5):407-413.
- Gumus P, Buduneli E, Biyikoglu B, Aksu K, Sarac F, Buduneli N *et al.* (2013). Gingival crevicular fluid and serum levels of APRIL, BAFF and TNF-alpha in rheumatoid arthritis and osteoporosis patients with periodontal disease. *Archives of oral biology* 58(10):1302-1308.
- Gupta S, Gupta H, Mandhyan D, Srivastava S (2013). Bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw. *National journal of maxillofacial surgery* 4(2):151-158.

- Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R *et al.* (2014). Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury* 45 Suppl 2 :S3-7.
- Hammond PT (1999). Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 4(6):430-442.
- Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R (2014). Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury* 45 Suppl 2 :S8-S15.
- HAS (2013). Substituts osseux - Rapport d'évaluation: Haute Autorité de Santé (HAS).
- Hayden EC (2011). Stem cells: The growing pains of pluripotency. *Nature* 473(7347):272-274.
- Hench LL, Polak JM (2002). Third-generation biomedical materials. *Science* 295(5557):1014-1017.
- Hernigou P, Beaujean F (1997). [Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning]. *Revue de chirurgie orthopedique et reparatrice de l'appareil moteur* 83(1):33-40.
- Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H (2005). Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 87(7):1430-1437.
- Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H (2006). Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *The Journal of bone and joint surgery American* 88 (Suppl 1.2):322-327.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990). The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery* 1(1):60-68.
- Huang Z-M, He C-L, Yang A, Zhang Y, Han X-J, Yin J *et al.* (2006). Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 77A(1):169-179.
- Huck O, Saadi-Thiers K, Tenenbaum H, Davideau JL, Romagna C, Laurent Y *et al.* (2011). Evaluating periodontal risk for patients at risk of or suffering from atherosclerosis: recent biological hypotheses and therapeutic consequences. *Archives of cardiovascular diseases* 104(5):352-358.
- Huck O, Elkaim R, Davideau JL, Tenenbaum H (2014). Porphyromonas gingivalis-impaired innate immune response via NLRP3 proteolysis in endothelial cells. *Innate immunity*.
- Hutmacher DW (2008). Scaffold and implant design : Considerations relating to characterization of biodegradability and bioresorbability. Degradation rate of Bioresorbable Materials: Prediction and Evaluation. In: F Buchanan editor: Elsevier, pp. 319-353.

- Ikeuchi M, Izumi M, Aso K, Sugimura N, Kato T, Tani T (2014). Effects of intra-articular hyaluronic acid injection on immunohistochemical characterization of joint afferents in a rat model of knee osteoarthritis. *European journal of pain (London, England)*.
- Illum L (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research* 15(9):1326-1331.
- Imbeau J (2005). Introduction to through-transmission alveolar ultrasonography (TAU) in dental medicine. *Cranio : the journal of craniomandibular practice* 23(2):100-112.
- Jacobson BS, Branton D (1977). Plasma membrane: Rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. *Science* 195(4275):302-304.
- Jessel N, Atalar F, Lavalley P, Mutterer J, Decher G, Schaaf P *et al.* (2003). Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Advanced Materials* 15(9):692-695.
- Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, Lavalley P, Haikel Y, Schaaf P *et al.* (2006). Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 103(23):8618-8621.
- Johnston APR, Cortez C, Angelatos AS, Caruso F (2006). Layer-by-layer engineered capsules and their applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11(4):203-209.
- Jovanovic SA, Nevins M (1995). Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 15(1):56-69.
- Kanus JA (1996). Textbook of osteoporosis: Oxford : Blackwell Science Ltd.
- Karageorgiou V, Kaplan D (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26 (27):5474-5491.
- Karring T (2000). Regenerative periodontal therapy. *Journal of the International Academy of Periodontology* 2(4):101-109.
- Kasaj A, Reichert C, Gotz H, Rohrig B, Smeets R, Willershausen B (2008). *In vitro* evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head & face medicine* 4 :22.
- Kehoe S, Zhang XF, Boyd D (2012). FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. *Injury* 43(5):553-572.
- Kenawy E-R, Layman JM, Watkins JR, Bowlin GL, Matthews JA, Simpson DG *et al.* (2003). Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials* 24(6):907-913.
- Keogh MB, FJ OB, Daly JS (2010). A novel collagen scaffold supports human osteogenesis--applications for bone tissue engineering. *Cell and tissue research* 340(1):169-177.

- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24(5):1294-1301.
- Khaksar P (2014). Le parodonte, c'est quoi?
- Kim DK, Han SW, Kim CH, Hong JD, Kim K (1999). Morphology of multilayers assembled by electrostatic attraction of oppositely charged model polyelectrolytes. *Thin Solid Films* 350(1-2):153-160.
- Kisiel M, Klar AS, Martino MM, Ventura M, Hilborn J (2013). Evaluation of injectable constructs for bone repair with a subperiosteal cranial model in the rat. *PLoS One* 8(8):e71683.
- Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW *et al.* (2005). T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of biomedical science* 12(1):47-57.
- Koh HS, Yong T, Chan CK, Ramakrishna S (2008). Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials* 29(26):3574-3582.
- Kotov NA (1999). Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions. *Nanostructured Materials* 12(5):789-796.
- Kourkouta S, Bailey GC (2014). Periradicular regenerative surgery in a maxillary central incisor: 7-year results including cone-beam computed tomography. *Journal of endodontics* 40(7):1013-1019.
- Kozlovsky A, Aboodi G, Moses O, Tal H, Artzi Z, Weinreb M *et al.* (2009). Bio-degradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide) applied in a double-layer technique in rats. *Clin Oral Implants Res* 20(10):1116-1123.
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E *et al.* (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101(9):3722-3729.
- Kumar G, Tison CK, Chatterjee K, Pine PS, McDaniel JH, Salit ML *et al.* (2011). The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials* 32(35):9188-9196.
- Kusumoto K, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Iizuka T (1996). Self-regenerating bone implant: ectopic osteoinduction following intramuscular implantation of a combination of rhBMP-2, atelopeptide type I collagen and porous hydroxyapatite. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 24(6):360-365.
- Langer R, Tirrell DA (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature* 428(6982):487-492.

- Laurent D, Schlenoff JB (1997). Multilayer Assemblies of Redox Polyelectrolytes. *Langmuir* 13(6):1552-1557.
- Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R *et al.* (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell* 8(1):106-118.
- Ledford CK, Nunley JA, 2nd, Viens NA, Lark RK (2013). Bovine xenograft failures in pediatric foot reconstructive surgery. *Journal of pediatric orthopedics* 33(4):458-463.
- Lee CH, Singla A, Lee Y (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* 221(1-2):1-22.
- Lee D, Rubner MF, Cohen RE (2006a). All-Nanoparticle Thin-Film Coatings. *Nano Letters* 6(10):2305-2312.
- Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA (2008). Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 14(1):61-86.
- Lee JH, Lee HB, Andrade JD (1995). Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Progress in Polymer Science* 20(6):1043-1079.
- Lee JS, Lee JS, Roh HL, Kim CH, Jung JS, Suh KT (2006b). Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: comparative analysis according to the risk factor. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 24(4):604-609.
- Li S, Vert M (1995). Biodegradation of aliphatic polyesters. *Degradable polymers, principles and application*, pp.71-131.
- Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y, Wang Y (2014a). Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *International journal of molecular medicine* 34(3):695-704.
- Li Y, Charif N, Mainard D, Bensoussan D, Stoltz JF, de Isla N (2014b). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Bio-medical materials and engineering* 24(0):47-52.
- Liang D, Hsiao BS, Chu B (2007). Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(14):1392-1412.
- Lim MH, Ong WK, Sugii S (2014). The current landscape of adipose-derived stem cells in clinical applications. *Expert reviews in molecular medicine* 16 :e8.
- Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ (1996). Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19(1 Suppl):1S-12S.
- Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A (1995). Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation* 60(1):1-9.

- Lvov Y, Ariga K, Ichinose I, Kunitake T (1995). Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *Journal of the American Chemical Society* 117(22):6117-6123.
- Lyu S, Untereker D (2009). Degradability of polymers for implantable biomedical devices. *International journal of molecular sciences* 10(9):4033-4065.
- MacArthur BD, Oreffo RO (2005). Bridging the gap. *Nature* 433(7021):19.
- Macé B (2008). Histologie - Bases fondamentales. Omniscience ed.
- Mackie EJ (2003). Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35(9):1301-1305.
- Mansbridge JN (2009). Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 20(5):563-567.
- Maravic M, Le Bihan C, Landais P, Fardellone P (2005). Incidence and cost of osteoporotic fractures in France during 2001. A methodological approach by the national hospital database. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16(12):1475-1480.
- Margossian T, Reppel L, Makdissy N, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C (2012). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Bio-medical materials and engineering* 22(4):243-254.
- Marsell R, Einhorn TA (2011). The Biology of Fracture Healing. *Injury* 42(6):551-555.
- Martins M, Azoia NG, Shimanovich U, Matama T, Gomes AC, Silva C *et al.* (2014). Design of novel BSA/hyaluronic acid nanodispersions for transdermal pharma purposes. *Molecular pharmaceutics* 11(5):1479-1488.
- Mathieu M, Rigutto S, Ingels A, Spruyt D, Stricwant N, Kharroubi I *et al.* (2013). Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. *Bone* 53(2):391-398.
- Mathon DH, Frayssinet P, Asimus E, Chanoit G, Collard P, Autefage A (1998). Development of a Segmental Long-bone Defect Model in Sheep. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* (1):6-12.
- Maurer P, Hohenester E, Engel J (1996). Extracellular calcium-binding proteins. *Current opinion in cell biology* 8(5):609-617.
- Maurer T, Zimmermann G, Maurer S, Stegmaier S, Wagner C, Hansch GM (2012). Inhibition of osteoclast generation: a novel function of the bone morphogenetic protein 7/osteogenic protein 1. *Mediators of inflammation* 2012 :171-209.

- McClain PK, Schallhorn RG (2000). Focus on furcation defects--guided tissue regeneration in combination with bone grafting. *Periodontology 2000* 22 :190-212.
- McKee MD, Glimcher MJ, Nanci A (1992). High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *The Anatomical record* 234(4):479-492.
- Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, Fioretti F, Ladam G, Kuchler-Bopp S *et al.* (2012). Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1):483-490.
- Meng S, Liu Z, Shen L, Guo Z, Chou LL, Zhong W *et al.* (2009). The effect of a layer-by-layer chitosan heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials* 30(12):2276-2283.
- Middleton JC, Tipton AJ (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21(23):2335-2346.
- Mirman V (2012). L'Ostéoporose : Etat des lieux, perspectives et rôle du pharmacien d'officine dans sa prise en charge, Faculté de Pharmacie de Grenoble.
- Mkhabela VJ, Ray SS (2014). Poly(epsilon-caprolactone) nanocomposite scaffolds for tissue engineering: a brief overview. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 14(1):535-545.
- Moghe AK, Hufenus R, Hudson SM, Gupta BS (2009). Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of polycaprolactone. *Polymer* 50(14):3311-3318.
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J *et al.* (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443(7110):448-452.
- Mota A, Sahebghadam Lotfi A, Barzin J, Hatam M, Adibi B, Khalaj Z *et al.* (2014). Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Behaviors on PCL/Gelatin Nanofibrous Scaffolds Modified with A Collagen IV-Derived RGD-Containing Peptide. *Cell journal* 16(1):1-10.
- Muller K, Quinn JF, Johnston APR, Becker M, Greiner A, Caruso F (2006). Polyelectrolyte functionalization of electrospun fibers. *Chemistry of Materials* 18(9):2397-2403.
- Nam YS, Park TG (1999). Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials* 20(19):1783-1790.
- Nanci A, Bosshardt DD (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000* 40 :11-28.
- Nataf S (2009). Histologie, le tissu osseux. Université de Lyon/Hospices Civils de Lyon.
- Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE (2006). Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108(6):2114-2120.

- Neyret P, Ait Si Selmi T, Barnouin L (2007). CARTIPATCH®. Une nouvelle perspective pour les greffes de cartilage. Résultats de l'étude clinique phase II. *e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie* 6(3):05-09.
- Nkenke E, Neukam FW (2014). Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: Morbidity, resorption and implant survival. *European journal of oral implantology* 7(2):203-217.
- Nobusawa A, Sano T, Yokoo S, Oyama T (2014). Ameloblastic carcinoma developing in preexisting ameloblastoma with a mutation of the p53 gene: a case report. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*.
- Oda S, Kinoshita A, Higuchi T, Shizuya T, Ishikawa I (1997). Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Journal of medical and dental sciences* 44(3):53-62.
- Ohbayashi Y, Miyake M, Sawai F, Minami Y, Iwasaki A, Matsui Y (2013). Adjunct teriparatide therapy with monitoring of bone turnover markers and bone scintigraphy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 115(4):e31-37.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research* 9(1):18.
- Owen M, Friedenstein AJ (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation symposium* 136 :42-60.
- Pal US, Mohammad S, Singh RK, Das S, Singh N, Singh M (2012). Platelet-rich growth factor in oral and maxillofacial surgery. *National journal of maxillofacial surgery* 3(2):118-123.
- Park H, Lee KY, Lee SJ, Park KE, Park WH (2007). Plasma-treated poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for tissue engineering. *Macromolecular Research* 15(3):238-243.
- Park JH, Schwartz Z, Olivares-Navarrete R, Boyan BD, Tannenbaum R (2011). Enhancement of Surface Wettability via the Modification of Microtextured Titanium Implant Surfaces with Polyelectrolytes. *Langmuir* 27(10):5976-5985.
- Peroglio M (2008). Composites Organiques-inorganiques poreux pour la substitution osseuse. Lyon, Institut National des Science Appliquées de Lyon.
- Pham QP, Sharma U, Mikos AG (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Engineering* 12(5):1197-1211.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD *et al.* (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.
- Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE (2014). Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 14(1):15-56.

- Porter JR, Ruckh TT, Popat KC (2009). Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress* 25(6):1539-1560.
- Pountos I, Panteli M, Panagiotopoulos E, Jones E, Giannoudis PV (2014). Can we enhance fracture vascularity: What is the evidence? *Injury* 45 Suppl 2 :S49-57.
- Prabhakaran MP, Venugopal J, Chan CK, Ramakrishna S (2008). Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Nanotechnology* 19(45):455102.
- Prieur WD, Sumner-Smith G (1984). Fracture healing processes. In: Manual of internal fixation in small animal. Berlin: Springer-Verlag, pp. 8-11.
- Purcell BP, Kim IL, Chuo V, Guinen T, Dorsey SM, Burdick JA (2014). Incorporation of Sulfated Hyaluronic Acid Macromers into Degradable Hydrogel Scaffolds for Sustained Molecule Delivery. *Biomaterials science* 2 :693-702.
- Qianhua K, Wenyi Y, Guozheng K, Qingping S (2013). Oliver–Pharr indentation method in determining elastic moduli of shape memory alloys—A phase transformable material. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 61(10):2015-2033.
- Queiroz-Junior CM, Bessoni RL, Costa VV, Souza DG, Teixeira MM, Silva TA (2013). Preventive and therapeutic anti-TNF-alpha therapy with pentoxifylline decreases arthritis and the associated periodontal co-morbidity in mice. *Life sciences* 93(9-11):423-428.
- Raftery R, O'Brien FJ, Cryan SA (2013). Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications. *Molecules (Basel, Switzerland)* 18(5):5611-5647.
- Rahn BA (1982). Bone healing : histologie and physiologic concept. In: Bone in clinical orthopaedics. Philadelphia: WB Saunders Company, pp. 335-386.
- Ramier J, Boudierlique T, Stoilova O, Manolova N, Rashkov I, Langlois V *et al.* (2014). Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 38 :161-169.
- Randell A, Sambrook PN, Nguyen TV, Lapsley H, Jones G, Kelly PJ *et al.* (1995). Direct clinical and welfare costs of osteoporotic fractures in elderly men and women. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 5(6):427-432.
- Reichenbach S, Blank S, Rutjes AW, Shang A, King EA, Dieppe PA *et al.* (2007). Hyaluronic acid versus hyaluronic acid for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis and rheumatism* 57(8):1410-1418.
- Reid IR (2009). Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? *Bone* 44(1):4-10.

- Reppel L, Margossian T, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Leger L *et al.* (2014). Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. *Current stem cell research & therapy* 9(4) :306-318.
- Requicha JF, Moura T, Leonor IB, Martins T, Munoz F, Reis RL *et al.* (2014). Evaluation of a starch-based double layer scaffold for bone regeneration in a rat model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 32(7):904-909.
- Retzepi M, Donos N (2010). Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clinical Oral Implants Research* 21(6):567-576.
- Rinaudo M (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31(7):603-632.
- Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P (2014). Cell therapy for bone repair. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR* 100(1 Suppl):S107-112.
- Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertel M, Scherbaum W, Becker J (2004). Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clinical Oral Implants Research* 15(4):443-449.
- Ruhin-Poncet B, Picard A, Martin-Duverneuil N, Albertini A-F, Goudot P (2011). Keratocysts (or keratocystic epithelial odontogenic tumors). *Revue de Stomatologie et de Chirurgie maxillo-faciale* 112(2):87-92.
- Rujitanaroj P-O, Pimpha N, Supaphol P (2008). Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. *Polymer* 49(21):4723-4732.
- Ryser HJP, Shen WC (1978). Conjugation of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(8):3867-3870.
- Saadi-Thiers K, Huck O, Simonis P, Tilly P, Fabre JE, Tenenbaum H *et al.* (2013). Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and Porphyromonas gingivalis infection. *Journal of periodontology* 84(3):396-406.
- Salai M, Amit Y, Velkkes S, H. H (1996). The Role of Massive Bone Allografts in Traumatic Bone Loss. In: *Orthopaedic Allograft Surgery*. Vienne: Springer-Verlag, pp. 219-226.
- Salgado AJ, Gomes ME, Chou A, Coutinho OP, Reis RL, Hutmacher DW (2002). Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* 20(1-2):27-33.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience* 4(8):743-765.

- Sammons J, Ahmed N, El-Sheemy M, Hassan HT (2004). The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3). *Stem cells and development* 13(3):273-280.
- Samuel RE, Shukla A, Paik DH, Wang MX, Fang JC, Schmidt DJ *et al.* (2011). Osteoconductive protamine-based polyelectrolyte multilayer functionalized surfaces. *Biomaterials* 32(30):7491-7502.
- Santo VE, Gomes ME, Mano JF, Reis RL (2012). From nano-to macro-scale: Nanotechnology approaches for spatially controlled delivery of bioactive factors for bone and cartilage engineering. *Nanomedicine* 7(7):1045-1066.
- Sasaki R, Watanabe Y, Ando T, Akizuki T (2014). Two stage enucleation and deflation of a large unicystic ameloblastoma with mural invasion in mandible. *Craniofacial trauma & reconstruction* 7(2):139-142.
- Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A (1997). Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials* 18(7):535-538.
- Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wustefeld M, Sager M, Ferrari D *et al.* (2008). Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 19(4):402-415.
- Sensebe L, Bourin P, Tarte K (2011). Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Human gene therapy* 22(1):19-26.
- Silva H, Conboy IM (2008). Aging and stem cell renewal. In: StemBook. Cambridge MA: : 2008 Haroldo Silva and Irina M. Conboy.
- Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A (2004). Poly-[epsilon]-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 278(1):1-23.
- Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE (1989). Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 4(5):783-788.
- Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI (1999). Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 17(2):205-213.
- Song JJ, Celeste AJ, Kong FM, Jirtle RL, Rosen V, Thies RS (1995). Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology* 136(10):4293-4297.
- Sorlier P, Denuzière A, Viton C, Domard A (2001). Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* 2(3):765-772.

- Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107(4):1484-1490.
- Steigman SA, Armant M, Bayer-Zwirello L, Kao GS, Silberstein L, Ritz J *et al.* (2008). Preclinical regulatory validation of a 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol. *Journal of pediatric surgery* 43(6):1164-1169.
- Stomatologie. Collège hospitalo-universitaire français de chirurgie maxillo-faciale et stomatologie (2011). Tumeurs maxillo-mandibulaires. In: C illustré editor: Elsevier/Masson.
- Suh KT, Kim SW, Roh HL, Youn MS, Jung JS (2005). Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clinical orthopaedics and related research* (431):220-225.
- Sun H, Önnby S (2006). Facile polyester surface functionalization via hydrolysis and cell-recognizing peptide attachment. *Polymer International* 55(11):1336-1340.
- Suzuki JB, Bronstein D (2013). Guided bone regeneration for mandibular implants. *Journal of the Massachusetts Dental Society* 62(1):12-15.
- Taba M, Jr., Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV (2005). Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthodontics & craniofacial research* 8(4):292-302.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676.
- Tal H, Moses O, Kozlovsky A, Nemcovsky C (2012). Bioresorbable Collagen Membranes for Guided Bone Regeneration, In: Bone regeneration: InTech, pp. 30.
- Tannoury CA, An HS (2014). Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 14(3):552-559.
- Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M (2003). Bioactive Coatings of Endovascular Stents Based on Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules* 4(6):1564-1571.
- Thierry B, Kujawa P, Tkaczyk C, Winnik FM, Bilodeau L, Tabrizian M (2005). Delivery Platform for Hydrophobic Drugs: Prodrug Approach Combined with Self-Assembled Multilayers. *Journal of the American Chemical Society* 127(6):1626-1627.
- Thomas V, Jagani S, Johnson K, Jose MV, Dean DR, Vohra YK *et al.* (2006). Electrospun bioactive nanocomposite scaffolds of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for bone tissue engineering. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 6(2):487-493.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS *et al.* (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-1147.

- Trombelli L (2005). Which reconstructive procedures are effective for treating the periodontal intraosseous defect? *Periodontology 2000* 37 :88-105.
- Turner CG, Klein JD, Steigman SA, Armant M, Nicksa GA, Zurakowski D *et al.* (2011). Preclinical regulatory validation of an engineered diaphragmatic tendon made with amniotic mesenchymal stem cells. *Journal of pediatric surgery* 46(1):57-61.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L (2007). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in immunology* 28(5):219-226.
- Vaquette C (2008). Elaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire. Nancy, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Venugopal J, Vadgama P, Sampath Kumar TS, Ramakrishna S (2007). Biocomposite nanofibres and osteoblasts for bone tissue engineering. *Nanotechnology* 18 :055101.
- Venugopal JR, Low S, Choon AT, Kumar AB, Ramakrishna S (2008). Nanobioengineered electrospun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration. *Artificial Organs* 32(5):388-397.
- Verstraete FJ, Arzi B, Huey DJ, Cissell DD, Athanasiou KA (2014). Regenerating Mandibular Bone Using rhBMP-2: Part 2-Treatment of Chronic, Defect Non-Union Fractures. *Veterinary surgery : VS*.
- Vigorita VJ (1999). Orthopaedic pathology Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Villar CC, Cochran DL (2010). Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dental clinics of North America* 54(1):73-92.
- Volpon JB (1994). Nonunion using a canine model. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 113(6):312-317.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U *et al.* (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology* 33(11):1402-1416.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ *et al.* (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22(7):1330-1337.
- Wang Y-H, Liu Y, Maye P, Rowe DW (2006). Examination of Mineralized Nodule Formation in Living Osteoblastic Cultures Using Fluorescent Dyes. *Biotechnology Progress* 22(6):1697-1701.
- Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, Acil Y, Bolte H, Kosmahl M *et al.* (2006). Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 27(17):3163-3167.

- Wiebe CB, Putnins EE (2000). The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *Journal (Canadian Dental Association)* 66(11):594-597.
- Wilde F, Hendricks J, Riese C, Pausch NC, Schramm A, Heufelder M (2011). Bone regeneration without bone grafting after resection of a segment of the mandible to treat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 69(10):2657-2662.
- Wilk A (2008). Kystes et tumeurs des maxillaires.
- Williamson RA (2010). Surgical management of bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 39(3):251-255.
- Woo I, Le BT (2004). Maxillary sinus floor elevation: review of anatomy and two techniques. *Implant dentistry* 13(1):28-32.
- Woodard JC, Riser WH (1991). Morphology of fracture nonunion and osteomyelitis. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 21(4):813-844.
- Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA *et al.* (1991). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *The Journal of cell biology* 113(3):681-687.
- Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 7(6):679-689.
- Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M *et al.* (2005). Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23(1):3-9.
- Yoo HS, Kim TG, Park TG (2009). Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(12):1033-1042.
- Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG (1992). Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clinical orthopaedics and related research* (281):275-294.
- Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M *et al.* (2011). High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Engineering Part A* 17(9-10):1389-1399.
- Zeiss C (2010). Imaging Biological Samples Using The ORION PLUS Helium Ion Microscope. Bodycote.
- Zhang F, Ren LF, Lin HS, Yin MN, Tong YQ, Shi GS (2012). The optimal dose of recombinant human osteogenic protein-1 enhances differentiation of mouse osteoblast-like cells: an in vitro study. *Archives of oral biology* 57(5):460-468.

- Zhang X, Kovtun A, Mendoza-Palomares C, Oulad-Abdelghani M, Fioretti F, Rinckenbach S *et al.* (2010a). SiRNA-loaded multi-shell nanoparticles incorporated into a multilayered film as a reservoir for gene silencing. *Biomaterials* 31(23):6013-6018.
- Zhang Y, Reddy VJ, Wong SY, Li X, Su B, Ramakrishna S *et al.* (2010b). Enhanced biomineralization in osteoblasts on a novel electrospun biocomposite nanofibrous substrate of hydroxyapatite/collagen/chitosan. *Tissue Engineering - Part A* 16(6):1949-1960.
- Zhang Y, Zhang X, Shi B, Miron R (2013). Membranes for guided tissue and bone regeneration. *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery* 1(1):1-10.
- Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474(7350):212-215.
- Zhen P, Jiandong D (2012). Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus* 2(3):366-377.
- Zhou J, Wang D, Liang T, Guo Q, Zhang G (2014). Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells: characteristics and therapeutic applications. *Archives of gynecology and obstetrics* 290(2):223-231.
- Zhu H, Ji J, Shen J (2004). Construction of multilayer coating onto poly-(dl-lactide) to promote cytocompatibility. *Biomaterials* 25(1):109-117.
- Zong C, Qian X, Tang Z, Hu Q, Chen J, Gao C *et al.* (2014). Biocompatibility and bone-repairing effects: comparison between porous poly-lactic-co-glycolic acid and nano-hydroxyapatite/poly(lactic acid) scaffolds. *Journal of biomedical nanotechnology* 10(6):1091-1104.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ *et al.* (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 7(2):211-228.
- Zuk PA (2010). The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Molecular biology of the cell* 21(11):1783-1787.

Liste des publications et valorisation

Publications acceptées

Eap S, Ferrand A, Mendoza-Palomares C, Hébraud A, Stoltz J-F, Mainard D, Schlatter G & Benkirane-Jessel N (2012). Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Biomedical Material and Engineering*. 22(1-3):137-41.

Eap S, Keller L, Schiavi J, Fioretti F & Benkirane-Jessel N (2013). Regenerative Nanomedicine. *JSM Nanotechno Nanomed*. 1:2.

Eap S, Ferrand A, Machi V, Ball V, Huck O & Benkirane-Jessel N (2013). Polydopamine Particles Effect on Melanoma Cells Proliferation and Melanin Secretion. *Adv Chem Eng Sci*. 3(3A):1-10.

Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Fioretti F, Ladam G & Benkirane-Jessel N (2013). Collagen implants equipped by “fishscale”- like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine*. 9(8): 1253-61.

Eap S #, Ferrand A #, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, Atmani H, Mély Y, Fioretti F, Schlatter G, Kuhn L, Ladam G & Benkirane-Jessel N (2014). Osteogenetic Properties of Electrospun Nanofibrous PCL Scaffolds Equipped with Chitosan-based Nanoreservoirs of Growth Factors. *Macromolecular Bioscience*. 14(1):45-55.

Eap S, Bécavin T, Kokten T, Keller L, Fioretti F, Weickert J-L, Deveaux E, Benkirane-Jessel N & Kuchler-Bopp S (2014). Nanofibers Implant Functionalized by NGF as New Strategy to Innervate Bioengineered Tooth. *Adv Health Care Material* 3(3):386-91.

S Eap, L Keller, A Ferrand, J Schiavi, D Lahiri, S Lemoine, S Facca, F Fioretti, D Mainard, A Agarwal & N Benkirane-Jessel (2014). Nanomechanical properties of active nanofibrous implants after in vivo bone regeneration. *Nano Life*. doi: 10.1142/S1793984414500019

Eap S, Morand D, Clauss F, Huck O, Stoltz J-F, Lutz J-C, Benkirane-Jessel N & Keller L (2014). Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce Bone. *Biomed Mater Eng*. In press.

P Schwinté, L Keller, S Eap, D Mainard & N Benkirane-Jessel (2014). Osteoarticular regenerative nanomedicine: Advances and drawbacks in articular cartilage regeneration implants. *Austin J Nanomed Nanotechnol*. In press

Nedjari S, Eap S, Hébraud A, Wittmer C R, Benkirane-Jessel N & Schlatter G (2014) Electrospun Honeycomb as Nests for Controlled Osteoblast Spatial Organization. *Macromolecular Bioscience*. In press

En cours de soumission

Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, Gauthier C, Sebastian V, Schwinté P & Benkirane-Jessel N (2014). Living Thick Nanofibrous Implant bi-functionalized with Active Growth Factor and Stem Cells for Bone Regeneration. *International Journal of Nanomedicine*. Submitted.

S Eap#, L Keller#, J Schiavi#, O Huck, F Clauss, J-L Davideau, D Brasse, P Schwinté, D Mainard, M Arruebo, JM. Kelm & N Benkirane-Jesse (2014). Advanced Double 3D Nanostructured Material: 3D Well-Organized Endogenous Extra-Cellular Collagen Nanofibers into Nanofibers Scaffolds for Regenerative Nanomedicine. *Advanced Functional Material*. Submitted.

These authors have contributed equally to this work

Brevet déposé

Three-dimensional scaffold functionalized for tissue regeneration: EB3008-AF. BET13P2142, 2013

Liste des communications

Eap S, Ferrand A, Mendoza-Palomarès C, Hébraud A, Stoltz J-F, Mainard D, Schlatter G, Benkirane-Jessel N (2012). Membrane 3D nanofibreuse pour la régénération osseuse. *Biomed Mater Eng*. 22(1-3):137-41. **6ème Congrès Rencontre Textile Santé 2012 (RTS 2012). Dispositifs Médicaux et Médicaments : mariage de raison? Mars 2012, Saint-Etienne, France.**

Eap S, Morand S, Mendoza-Palomarès C, Stoltz J-F, Mainard D, Benkirane-Jessel N (2012). Membrane 3D nanofibreuse pour la régénération osseuse. *Biomed Mater Eng*. 22(1-3):137-41. **Journées Scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS). Juin 2013, Strasbourg, France.**

Eap S, Morand S, Mendoza-Palomarès C, Stoltz J-F, Mainard D, Benkirane-Jessel N (2012). Membrane 3D nanofibreuse pour la régénération osseuse. *Biomed Mater Eng*. 22(1-3):137-41. **Forum des jeunes chercheurs en odontologie/Collège National des Enseignants en Sciences Biologiques Odontologiques (CNESBO). Septembre 2013, Strasbourg, France.**

Eap S, Morand D, Clauss F, Huck O, Stoltz J-F, Lutz J-C, Benkirane-Jessel N, Keller L. *Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce Bone*. **5th China-France International Symposium of Stem Cells. Décembre 2013, Kunming, Chine.**

Prix scientifiques

Lauréate du **Prix Avenir 2011 de l'Association des Chimistes de l'Industrie Textile (ACIT)** pour le projet intitulé “Développement de membrane 3D à bases de nanofibres synthétiques pour la régénération osseuse”, Roubaix 2011.

Lauréate du **Concours du Meilleur Poster Scientifique aux 6ème Rencontre Textile Santé 2012**, Saint-Etienne 2012

RÉSUMÉ

Notre équipe a développé une stratégie innovante de fonctionnalisation d'implants nanofibreux synthétiques à base de nanoréservoirs actifs pour la médecine régénérative osseuse. Notre objectif essentiel est de proposer un implant synthétique, biodégradable, et nanostructuré permettant d'accélérer la réparation du tissu osseux. Ces nouveaux implants synthétiques représentent un choix alternatif aux membranes de collagène d'origine animale déjà commercialisées et utilisées en clinique.

Dans un premier temps, notre stratégie de fonctionnalisation a été appliquée aux membranes de collagène et a permis de valider l'efficacité de nos nanoréservoirs actifs *in vitro* et *in vivo*. Cette stratégie consiste à construire des nanoréservoirs de chitosane, contenant le facteur ostéoinducteur, la protéine morphogénique osseuse 2 ou 7 (BMP-2 ou BMP-7), afin d'enrober les nanofibres de nos implants. Dans un deuxième temps, nous avons conçu un implant biomimétique et synthétique, à partir d'un polymère biocompatible et biodégradable, le poly(ϵ -caprolactone) (PCL), approuvé par la FDA (US Food and Drug Administration) pour une application clinique. Les nanofibres de PCL ont été élaborées grâce à la technique de l'électrospinning afin de mimer la structure collagénique de la matrice extracellulaire. L'optimisation de ce procédé a permis la mise en œuvre d'implants d'épaisseurs différentes (jusqu'à 10 mm). La double fonctionnalisation de l'implant a permis de le rendre bioactif et vivant en utilisant la combinaison de facteur de croissance et de cellules humaines primaires autologues ou de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse. Notre stratégie a été validée *in vitro*, et *in vivo* grâce à des implantations en site osseux chez le modèle murin. L'efficacité de la double fonctionnalisation des implants de PCL a ainsi été mise en évidence par l'accélération de la régénération osseuse *in vivo*.

L'activité de ces implants fonctionnalisés de nanoréservoirs bioactifs est en cours d'analyse dans le cadre de tests précliniques pour une application maxillo-faciale, parodontale et orthopédique en vue d'obtenir un marquage CE. De plus, une start-up (ARTiOS NanoMed) basée sur cette nanotechnologie a été créée en Juin 2014.

En conclusion, la technologie développée par notre laboratoire a permis une avancée dans le domaine de la nanomédecine régénérative osseuse et présente un fort potentiel d'application clinique pour la médecine de demain incorporant les nanotechnologies.

Mots clés : nanomédecine, régénération osseuse, biomatériau, électrospinning, polycaprolactone, nanoréservoirs actifs, multicouche de polyélectrolytes, facteur de croissance, BMP, cellules souche mésenchymateuses, orthopédie, pathologie maxillo-faciale, maladie parodontale

ABSTRACT

Our team has developed a novel and unique strategy to functionalize nanofibrous and synthetic implants based on active nanoreservoirs for bone regenerative medicine. We propose a new synthetic biodegradable and nanostructured implant to accelerate restoration of bone tissue. These new implants could replace collagen membranes from animal origin and already used in the clinic. *In vitro* and *in vivo* validations of the efficiency of our strategy based on bioactive nanoreservoirs have been carried out onto these collagen membranes. Our active nanoreservoirs are based on chitosan containing osteoinductive growth factors such as bone morphogenetic protein 2 or 7 (BMP-2 or BMP-7) as a coating of the nanofibers implant. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) which is a biodegradable and biocompatible polymer approved by the FDA (US Food and Drug Administration), has been used to produce the synthetic and biomimetic implants. PCL nanofibers were produced by electrospinning in order to mimic the collagen bone extracellular matrix. Optimization of this process has allowed the elaboration of nanofibrous implants with different thicknesses reaching 10 mm. The functionalization of these implants was performed by combining not only growth factors but also human autologous primary cells or mesenchymal stem cells (from bone marrow). This strategy has been validated *in vitro* and *in vivo* thanks to bone site implantation in mice. Acceleration of bone regeneration *in vivo* has brought to light the efficiency of the double functionalization onto the PCL implants.

The efficiency of our functionalized implants is currently under study for pre-clinical trials in order to obtain authorization for applications in maxillo-facial, parodontal, and orthopaedic fields. Moreover, a start-up (ARTiOS NanoMed) based on this nanotechnology has been founded in June 2014.

To conclude, we believe that our technology could lead to a new generation of engineered bone implants for regenerative nanomedicine and will have a great potential to be used in the clinic in the near future.

Key words : nanomedicine, bone regeneration, biomaterial, electrospinning, polycaprolactone, active nanoreservoirs, layer-by-layer, growth factor, BMP, mesenchymal stem cell, orthopaedic, maxilla-facial pathology, periodontal diseases

Développement d'implants nanofibreux actifs pour la régénération osseuse

RÉSUMÉ

Notre équipe a développé une stratégie innovante de fonctionnalisation d'implants nanofibreux synthétiques à base de nanoréservoirs actifs pour la médecine régénérative osseuse. Notre objectif essentiel est de proposer un implant synthétique, biodégradable, et nanostructuré permettant d'accélérer la réparation du tissu osseux. Ces nouveaux implants synthétiques représentent un choix alternatif aux membranes de collagène d'origine animale. Notre stratégie consiste à construire des nanoréservoirs de chitosane, contenant des facteurs ostéoinducteurs tels que la BMP-2 afin d'enrober les nanofibres de nos implants. L'implant synthétique et biomimétique a été conçu à partir du poly(ϵ -caprolactone) (PCL), polymère biocompatible et biodégradable approuvé par la FDA, et élaboré grâce à la technique de l'électrospinning afin de mimer la matrice extracellulaire. L'optimisation de ce procédé a permis la mise en œuvre d'implants d'épaisseurs différentes (jusqu'à 10mm). La double fonctionnalisation de l'implant a permis de le rendre bioactif et vivant en utilisant la combinaison de facteur de croissance et de cellules souches mésenchymateuses. L'efficacité de la double fonctionnalisation des implants de PCL a ainsi été mise en évidence par l'accélération de la régénération osseuse *in vivo*.

L'activité de ces implants fonctionnalisés de nanoréservoirs bioactifs est en cours d'analyse dans le cadre de tests précliniques pour une application maxillo-faciale, parodontale et orthopédique en vue d'obtenir un marquage CE. De plus, une start-up (ARTiOS NanoMed) basée sur cette nanotechnologie a été créée.

En conclusion, nous pensons que la technologie développée par notre laboratoire a permis une avancée dans le domaine de la régénération osseuse et que cette technologie présente un fort potentiel d'application en clinique.

Mots clés : nanomédecine régénérative osseuse, biomatériau, électrospinning, polycaprolactone, nanoréservoirs actifs, multicouche de polyélectrolytes, facteur de croissance, BMP, cellules souche mésenchymateuses

ABSTRACT

Our team has developed a novel and unique strategy to functionalize nanofibrous and synthetic implants based on active nanoreservoirs for bone regeneration. We propose a new synthetic biodegradable and nanostructured implant to accelerate restoration of bone tissue. These new implants could replace collagen membranes from animal origin. The nanoreservoirs are based on chitosan containing osteoinductive growth factors such as BMP-2. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biodegradable and biocompatible polymer approved by FDA and has been used to produce the synthetic and biomimetic implants by electrospinning in order to mimic the bone extracellular matrix. Optimization of this process has allowed the elaboration of nanofibrous implants with different thicknesses reaching 10 mm. Using the combination of growth factors and mesenchymal stem cells in a double functionalization created a bioactive and living implant. This strategy has been validated *in vitro* and *in vivo* thanks to bone site implantation in murin model. Acceleration of bone regeneration *in vivo* has brought to light the efficiency of the double functionalization onto the PCL implants.

The functionalized implants bioactivity is still currently in study for pre-clinical trials in order to obtain authorization for applications in maxillo-facial, parodontal, and orthopaedic fields. Moreover, a start-up (ARTiOS NanoMed) based on this nanotechnology has been founded.

To conclude, we believe that our nanotechnology could lead to a new generation of engineered bone implants which has a great potential to be used in the clinic.

Key words : nanomedicine, bone regeneration, biomaterial, electrospinning, polycaprolactone, active nanoreservoirs, layer-by-layer, growth factor, BMP, mesenchymal stem cell