



**HAL**  
open science

# Développement de biomatériaux nanostructurés pour la régénération osseuse et ostéo-articulaire

Sybille Facca

► **To cite this version:**

Sybille Facca. Développement de biomatériaux nanostructurés pour la régénération osseuse et ostéo-articulaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0234 . tel-01749626

**HAL Id: tel-01749626**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749626>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

Par **Sybille FACCA**

**DEVELOPPEMENT DE BIOMATERIAUX NANOSTRUCTURÉS  
POUR LA REGENERATION OSSEUSE ET OSTEO-ARTICULAIRE**

Le 5 novembre 2012

**Membres du jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	M. Jean SIBILIA M. Laurent OBERT	PU-PH / Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg PU-PH/ UMR INSERM 645, Besançon, Université de Franche-Comté
<b>Examineurs :</b>	Mme Nadia BENKIRANE-JESSEL M. Jean-François KEMPF  M. Philippe LIVERNEAUX M. Jean-François STOLTZ	DR/ UMR INSERM 977, Université de Strasbourg (Directeur de thèse) PU-PH / Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg  PU-PH / UMR INSERM 977, Université de Strasbourg PU-PH/ UMR CNRS 7561, Nancy, Université de Lorraine

---

*Laboratoire de « Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire »  
UMR INSERM 977, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg*

## RESUME

L'ingénierie tissulaire a vu émerger dans la dernière décennie, la nanomédecine régénérative en combinant non seulement les cellules souches mais aussi les facteurs de croissance. Le but de ce travail a été d'utiliser les techniques de l'ingénierie osseuse et cartilagineuse pour améliorer ou créer des biomatériaux en les rendant bioactifs et vivants à une échelle nanométrique. Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au développement de biomatériaux (naturels ou synthétiques), tridimensionnels (3D), implantables et utilisables pour le traitement de diverses pathologies de l'appareil loco-moteur, qui sont capables d'induire une meilleure différenciation cellulaire et une régénération tissulaire plus stable. Nous avons développé 3 types d'implants nanostructurés, à base de titane recouvert d'hydroxyapatite et de nanotubes de carbone, de capsules ou de membranes nanofibreuses nanofonctionnalisées par des facteurs de croissance, qui ont permis d'obtenir une régénération osseuse ou ostéo-articulaire, *in vitro* comme *in vivo*.

Mots clés libres : facteurs de croissance, ingénierie tissulaire, multicouches de polyelectrolytes, implants nanostructurés, régénération ostéoarticulaire.

Mots clés rameaux : génie tissulaire, nanomédecine, os-régénération, facteurs de croissance, polyélectrolytes.

**TITRE EN ANGLAIS : DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED BIOMATERIALS FOR BONE AND OSTEO-ARTICULAR REGENERATION**

### RESUME EN ANGLAIS

During the last ten years, tissue engineering has merged with regenerative nanomedicine by combination, not only of stem cell technology but also of growth factors. The goal of this thesis was to use bone and cartilage engineering as a model, in order to improve and to develop active and living nanostructured implants. During this PhD studies, we were interested in the development of biomaterials (natural or synthetic), tridimensional (3D), transplantable for bone and cartilage diseases treatments, that are able to induce more cellular differentiation and improved tissue regeneration. In this thesis, we have developed 3 types of nanostructured implants, (i) titanium implants coated with hydroxyapatite and carbone nanotubes; (ii) active capsules functionalized by growth factors and stems cells for bone induction (*in vitro/in vivo*); (iii) electrospun nanofibrous membranes functionalized by growth factors and (Osteoblasts/Chondrocytes) for bone and cartilage regeneration, *in vitro* and *in vivo*.

Free key words: growth factors, tissue engineering, polyelectrolytes, nanostructured implants, osteoarticular regeneration.

Key words "rameaux": tissue engineering, nanomedicine, bone regeneration, growth factors, polyelectrolytes.



## **AVANT-PROPOS & REMERCIEMENTS**

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biomatériaux et d'Ingénierie Tissulaire (INSERM Unité 977) de la Faculté de Médecine de l'Université de Strasbourg, Bâtiment 3, 7<sup>ème</sup> étage, 11 rue Humann à Strasbourg, dirigé par le Dr Jean-Claude Voegel au sein de l'équipe I de l'Unité U 977 « Biomatériaux et d'Ingénierie Tissulaire » dirigée par le Dr Nadia Benkirane-Jessel.*

*Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation.*

***A mon Directeur de thèse, Madame Nadia Benkirane-Jessel,***

*Je te remercie de m'avoir soutenue, conseillée, encouragée et encadrée tout au long de ce travail. Merci de m'avoir enseigné et transmis ta rigueur scientifique. Que ce travail soit la continuité d'une collaboration fructueuse.*

***A notre Juge, Monsieur le Doyen et Professeur Jean Sibilia,***

*Vous avons le privilège que vous participiez à nouveau à notre jury de thèse. Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect.*

***A notre Juge, Monsieur le Professeur Laurent Obert,***

*Nous vous remercions de bien vouloir participer à notre jury de thèse et de nous faire bénéficier de votre expérience de chirurgien et de scientifique sur le sujet. Nous exprimons ici notre profonde reconnaissance.*

***A notre Juge, Monsieur le Professeur Jean-François Kempf,***

*Nous vous sommes reconnaissants d'avoir accepté de participer et de juger ce travail. Vous nous faites honneur de partager vos connaissances en chirurgie orthopédique. Nous vous en remercions vivement.*

***A notre Juge, Monsieur le Professeur Jean-François Stoltz,***

*Vous nous faites honneur de participer à notre jury de thèse. Vous nous faites le privilège de pouvoir partager votre expertise scientifique. Veuillez trouver ici l'expression de nos remerciements.*

***A notre Maître et Juge, Monsieur le Professeur Philippe Liverneaux,***

*Vous m'avez accordée un soutien inconditionnel dans tous mes projets professionnels. Vous m'avez toujours dirigée avec rigueur et patience. Je vous remercie de m'avoir formée, accueillie dans votre service, de votre grande disponibilité et de votre écoute toujours attentive. Vous m'avez transmis vos qualités de scientifique et enseigné vos compétences de chirurgien. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance la plus sincère et la plus durable.*

***A Monsieur le Docteur Carlos Palomares-Mendoza,***

*Merci pour ton aide précieuse à mes débuts dans un laboratoire.*

***A Monsieur le Docteur René Elkaïm,***

*Vous nous avez initiée et formée à la paillasse, toujours accueillie avec bienveillance et conseillée. Merci de nous avoir transmis le goût pour la Science.*

***A Mademoiselle le Docteur Florence Fioretti,***

*Merci d'avoir pu partager nos expériences et merci pour ton soutien amical.*

***A Monsieur le Docteur Philippe Choquet,***

*Vous nous avez écouté et conseillé. Je vous en remercie chaleureusement.*

***A Madame le Docteur Nadia Messadeq,***

*Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et le plaisir de rencontrer quelqu'un passionné par la microscopie électronique.*

***A Mademoiselle le Docteur Stéphanie Gouzou,***

*Merci pour tes corrections, ton soutien personnel et pour ton amitié.*

***A Madame le Docteur Marie-Caroline Géraud-Welby,*** ton soutien fidèle et amical pendant toutes nos études aura été essentiel.

***A Monsieur le Professeur Arvind Agarwal,*** remerciements pour votre accueil au sein de votre laboratoire de Nanomécanique et Nanotribologie et de Tribologie Haute Température, Département de Mécanique et d'Ingénierie des Matériaux, Université Internationale de Floride du Professeur A. Agarwal, et le traitement des résultats.

***A mes collègues du laboratoire INSERM,*** avec qui j'ai partagé les joies de la paillasse et de l'animalerie, Alice, Valérie, Sandy et à mes collègues de l'Université de Floride.

***A tous mes amis et collègues,***

*A ma sœur,*

*A mes grands-mères,*

***A mes parents,***

Merci pour votre soutien au cours de mes études et pour tout ce que vous m'avez transmis.

## TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
AVANT-PROPOS & REMERCIEMENTS.....	2
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS.....	16
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>18</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION &amp; ETAT DE L'ART.....</b>	<b>20</b>
<b>I - Le tissu osseux.....</b>	<b>21</b>
<i>I.1 Définitions et classifications.....</i>	<i>21</i>
<i>I.2 Les cellules osseuses.....</i>	<i>23</i>
<i>I.3 La matrice extra-cellulaire osseuse.....</i>	<i>25</i>
<i>I.4 Physiologie du remodelage osseux et ostéogénèse.....</i>	<i>27</i>
<b>II - Le tissu cartilagineux.....</b>	<b>29</b>
<i>II.1 Définitions et classifications.....</i>	<i>29</i>
<i>II.2 Les chondrocytes et leur matrice extra-articulaire.....</i>	<i>31</i>
<i>II.3 L'os sous-chondral.....</i>	<i>33</i>
<b>III - Les principales pathologies osseuses et ostéo-articulaires.....</b>	<b>34</b>
<i>III.1 L'ostéoporose.....</i>	<i>34</i>
<i>III.2 L'arthrose.....</i>	<i>36</i>
<b>IV - Les traitements.....</b>	<b>39</b>
<i>IV.1 Les traitements médicamenteux.....</i>	<i>39</i>
<i>IV.2 Les comblements chirurgicaux.....</i>	<i>44</i>
<b>V - Biomatériaux et ingénierie tissulaire.....</b>	<b>48</b>
<i>V.1 Les cellules.....</i>	<i>48</i>
<i>V.2 Les biomatériaux.....</i>	<i>52</i>
V.2.1 Définition & cahier des charges.....	52
V.2.2 Biomatériaux non dégradables.....	53
V.2.3 Biomatériaux dégradables.....	55
<i>V.3 Techniques de traitement et de fonctionnalisation des biomatériaux.....</i>	<i>62</i>
V.3.1 Le procédé de projection thermique par plasma chaud.....	63
V.3.2 La technique d'électrofilage.....	68
V.3.3 Technique des multicouches de polyelectrolytes.....	71
<b>CHAPITRE II : OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>74</b>
<b>CHAPITRE III : RESULTATS &amp; DISCUSSIONS.....</b>	<b>77</b>
<b>I - Fonctionnalisation des implants en titane (Publication n°1).....</b>	<b>78</b>
<i>I.1 Résumé du travail.....</i>	<i>79</i>

<i>I.2 Article</i> .....	81
<i>I.3 Résultats et discussion</i> .....	94
<b>II - Fonctionnalisation de capsules ostéoinductrices (Publication n°2)</b> .....	<b>97</b>
<i>II.1 Résumé du travail</i> .....	98
<i>II.2 Article</i> .....	100
<i>II.3 Résultats et discussion</i> .....	106
<b>III - Fonctionnalisation de membranes nanofibreuses par des nanoréservoirs actifs</b> <b>(Publication n°3)</b> .....	<b>109</b>
<i>III.1 Résumé du travail</i> .....	110
<i>III.2 Article</i> .....	112
<i>III.3 Résultats et discussion</i> .....	120
<b>IV - Propriétés nanomécaniques des membranes nanofibreuses</b> .....	<b>122</b>
<b>(Publication n°4 soumise)</b> .....	<b>122</b>
<i>IV.1 Résumé du travail</i> .....	123
<i>IV.2 Article</i> .....	125
<i>IV.4 Résultats et discussion</i> .....	140
<b>CHAPITRE IV : CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES</b> .....	<b>141</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>146</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>161</b>
<b>I - Matériel et méthodes</b> .....	<b>162</b>
<b>II - Autres publications</b> .....	<b>189</b>

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure de l'os compact ou cortical .....	21
Figure 2 : Jonction entre l'os cortical et l'os trabéculaire .....	21
Figure 3 : Echantillons d'os trabéculaire issus d'individus d'âge différent .....	22
Figure 4 : Ostéoblaste en microscopie électronique à transmission.....	23
Figure 5 : Ostéocyte en microscopie électronique à transmission .....	23
Figure 6 : Ostéoclaste en microscopie électronique à transmission.....	24
Figure 7 : Fibres de collagène de type I de la matrice extra-cellulaire .....	26
Figure 8 : Visualisation d'une lacune de résorption et d'une travée osseuse.....	28
Figure 9 : Front de minéralisation en microscopie optique.....	28
Figure 10 : Représentation du cartilage articulaire adulte selon Pujol .....	30
Figure 12 : Schéma d'un chondrocyte.....	31
Figure 13 : Coupe transversale d'une articulation de genou .....	33
Figure 14 : Arthrose de l'articulation trapézo-métacarpienne.....	38
Figure 15 : Principe de l'ingénierie tissulaire à partir de cellules autologues.....	48
Figure 16 : Les cellules souches mésenchymateuse de la lignée hématopoïétique .....	49
Figure 17 : Les cellules souches issues de l'oeuf fécondé au stade blastula.....	50
Figure 18 : Biomatériaux en titane pour la chirurgie de la main.....	55
Figure 19 : Structure chimique du chitosane.....	59
Figure 20 : Structure stéréochimique d'une chaîne polymère d'acide alginique .....	61
Figure 21 : Gélification de l'alginate lors de l'ajout de calcium Ca Cl <sub>2</sub> .....	62
Figure 22 : Structure de la boîte à œufs .....	62
Figure 23 : Technique de projection plasma utilisée pour le revêtement des implants.....	63
Figure 24 : Prothèse en titane recouverte d'hydroxyapatite par plasma spraying.....	64
Figure 25 : Image en MEB d'une couche de revêtement d'HA par plasma spraying.....	65
Figure 26 : Revêtement mixte HA et NTC par projection thermique de plasma chaud .....	67
Figure 27 : Schéma de la construction d'un film de PEM .....	72
Figure 28 : Pistolet utilisé pour réaliser le revêtement par technique de plasma spray .....	163
Figure 29 : Technique d'ultrasonication pour mélanger les poudres d'HA et de NTC .....	164
Figure 30 : Observation de CNT après utilisation de la technique d'ultrasonication .....	164
Figure 31 : Principe de fonctionnement du microscope confocal .....	166
Figure 32 : Machine d'electrospinning, aiguille et collecteur.....	167
Figures 33 : Membrane de PCL obtenue électrofilage (a), coupe au diamètre souhaité (b) ..	168
Figure 34 : Observation au MEB : des fibres déposées (a) et des nanoréservoirs (b) .....	168
Figures 35 : Dispositif de QCM D Q-sense type D301 (a), Cristal de quartz (b) .....	170
Figure 36 : Observation à J10 en MO de précipités de cristaux de calcium phosphate.....	174
Figure 37 : Schéma du protocole par technique « gouttes pendantes » sur plaque retournée	175
Figures 38 : Fraisage des 2 trépan (a), implantation de la membrane et suture (b).....	180
Figures 39 : Incision (a), implantation de la membrane (b), suture (c).....	180
Figure 40 : Membranes et peau en sous-cutané (a et b), membranes type calvaria (c).....	181
Figure 41 : Radiographie comparative des fémurs de souris .....	182
Figures 42 : Section par lame diamant d'un fémur de rat (a) et analyse macroscopique (b) .	183
Figures 43: Courbes charge-décharge par nanoindentation (a), sur os de souris (b) .....	184
Figure 44 : Nanoindenteur Hysitron®.....	185



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Diagnostic densitométrique d'ostéoporose chez les femmes ménopausées.....	34
Tableau 2 : Paramètres permettant d'ajuster le diamètre des fibres.....	70
Tableau 3 : répartition des implants titane selon 4 groupes .....	177
Tableau 4 : Composition d'un lattis de collagène .....	178
Tableau 5 : Liste des différents types de membranes implantées .....	181

## **LISTE DES PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS**

### **Publications internationales avec comité de lecture :**

FACCA S, CORTEZ C, MENDOZA-PALOMARES C, MESSADEQ N, DIERICH A, JOHNSTON APR, ZELIKIN AN, MAINARD D, VOEGEL JC, CARUSO F, BENKIRANE-JESSEL N. Active multilayered capsules as a new strategy for *in vivo* bone formation. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2010, 107, 3406-11

FACCA S, LAHIRI D, FIORETTI F, MESSADEQ N, BENKIRANE-JESSEL N, AGARWAL A. *In vivo* osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants. *ACS Nano*, 2011, 5, 4790-9

FACCA S, MENDOZA-PALOMARES C, FERRAND A, FIORETTI F, MAINARD D, BENKIRANE-JESSEL N. Smart Nano-Reservoirs of growth factors for bone regeneration. *ACS Nano*, 2011, 6, 483-90

### **Publications dans des revues sans comité de lecture :**

FACCA S. Rapport de stage : Mechanical and Biomaterials Engineering Center - Université Internationale de Floride – Novembre 2010 à Mai 2011. Bulletin des Orthopédistes Francophones, n°70, Oct 2011, p 10-12

FACCA S, MENDOZA-PALOMARES C, PERRIN-SCHMITT F, MAINARD P, LIVERNEAUX P, BENKIRANE-JESSEL N. Capsules bioactives de multicouches pour l'induction osseuse. *E-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie*, 2011

### **Communications dans des congrès internationaux avec actes publiés :**

FACCA S, GILLET P, STOLTZ JF, NETTER P, MAINARD D, VOEGEL JC, BENKIRANE-JESSEL N. Three-dimensional sprayed active biological gels and cells for tissue engineering application. *Biomed Mater Eng*, 2008, 18, 231-5

FERRAND A, MENDOZA-PALOMARES C, FIORETTI F, FACCA S, MAINARD D, DIERICH A, BENKIRANE-JESSEL N. Nanostructured active biomaterials for tissue engineering applications. *Open Conf Proc J*, 2010, 1, 197-9

**FACCA S, MENDOZA-PALOMARES C, PERRIN-SCHMITT F, MAINARD P, LIVERNEAUX P, BENKIRANE-JESSEL N.** Bone formation by growth factors embedded into nanostructured particles. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, 7, 482-5

### **Communications dans des congrès sans actes publiés :**

#### *Communications orale invitée*

**FACCA S.** Les biomatériaux en Chirurgie Orthopédique. Séminaire de l'Ecole Doctorale de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, 23 juin 2008

**FACCA S, MENDOZA-PALOMORES C, FIORETTI F, LIVERNEAUX P, VOEGEL JC.** Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. 6<sup>th</sup> International Conference on Diffusion in Solids and Liquids, Paris, France, 5-7 juillet 2010

**FACCA S.** Biomaterials for Orthopedic & Traumatologic Surgery. Séminaire à l'Université Internationale de Floride, 11 février 2011

**FACCA S.** Nanotechnologies. Nanodays, Sciences Museum of Miami, 2 avril 2011

**FACCA S.** Futurs implants en chirurgie de la main : abords mini-invasifs et biomatériaux résorbables ? Meet & Match, Biovalley trinational, 29 mars 2012

#### *Communications orales internationales*

**FACCA S, DIERICH A, VOEGEL JC, BENKIRANE-JESSEL N.** Nanostructured and multilayered active materials for clinical applications. Ecole Franco-Vénézuélienne de Nanotechnologie 2009 (ENANO 2009), Chonori-Caracas, Venezuela, 2-6 novembre 2009

**MENDOZA-PALOMORES C, FACCA S, DIERICH A, VOEGEL JC, BENKIRANE-JESSEL N.** Nanostructured active biomaterials for tissue engineering applications. 6<sup>th</sup> International Conference on Diffusion in Solids and Liquids, Paris, France, 5-7 juillet 2010

**FACCA S, MENDOZA-PALOMORES C, FIORETTI F, MAINARD P, LIVERNEAUX P, BENKIRANE-JESSEL N.** Bone formation induced by growth factors embedded into the nanostructured particles. SICOT 2011, XXV Triennial World Congress, Prague, Czech Republic, 6-9 septembre 2011

**FACCA S, LAHIRI D, FIORETTI F, MAINARD, LIVERNEAUX P, BENKIRANE-JESSEL N, AGARWAL A.** *In vivo* osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants. TMS 2012, Orlando, USA, 12-15 mars 2012

**FACCA S, FERRAND A, LEBAILLY F, BENKIRANE-JESSEL N, LIVERNEAUX P, FIORETTI F.** Development of a bioactive membrane with stem cells and growth factors for cartilage regeneration in hand surgery. Eurohand 2012, 17<sup>th</sup> congress of the Federation of European Societies for Surgery of the Hand, Antwerp, Belgium, 20-23 juin 2012

**FACCA S, LAHIRI D, FIORETTI F, BENKIRANE-JESSEL N, AGARWAL A.** Osseointegration of Carbon Nanotube Reinforced Hydroxyapatite Composite Coating on Titanium Implants: *in vivo* studies. Combined 33rd SICOT & 17th PAOA Orthopaedic World Conference, Dubai, United Arab Emirates, 28-30 novembre 2012

***Communications orales nationales***

**FACCA S, MENDOZA-PALOMORES C, FIORETTI F, LIVERNEAUX P, VOEGEL JC.** Capsules bioactives de multicouches pour l'induction osseuse. Séance du Prix du Jeune Talent Chirurgical, Académie de Chirurgie, Paris, 5 janvier 2011

**FACCA S, LAHIRI D, FIORETTI F, LIVERNEAUX P, BENKIRANE-JESSEL N, AGARWAL A.** Amélioration de l'ostéo-intégration d'implants en titane recouverts d'hydroxyapatite et de nanotubes de carbone : étude *in vivo*. 85<sup>e</sup> Congrès de la SOFCOT, Paris, 7-11 novembre 2011

**FACCA S, LAHIRI D.** Nanoreinforcement of hydroxyapatite coatings on titanium for osseointegration of orthopedic implants. 37<sup>e</sup> congrès de la société de biomécanique, Toulouse, 16 au 19 octobre 2012

**FACCA S, FERRAND A, PALOMARES-MENDOZA C, BENKIRANE-JESSEL N, LIVERNEAUX P, FIORETTI F.** Membranes nanofibreuses avec nanoréservoirs pour la régénération ostéoarticulaire et osseuse. 87<sup>e</sup> Congrès de la SOFCOT, Paris, 12-16 novembre 2012

***Communications affichées internationales***

**FACCA S, FERRAND A, LAHIRI D, MAINARD, LIVERNEAUX P, BENKIRANE-JESSEL N, FIORETTI F.** *In vivo* osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants for orthopedic surgery. Ecole thématique “Biomécanique et bioingénierie du vieillissement des tissus”, Marrakech, Maroc, 26 novembre au 3 décembre 2011

***Communications affichées nationales***

**FACCA S, MENDOZA C, FIORETTI F, MAINARD D, VOEGEL JC, JESSEL N.** Induction de la formation osseuse *in vivo* par des capsules nanostructurées fonctionnalisées. 85<sup>e</sup> Congrès de la SOFCOT, Paris, 8-12 novembre 2010 (eposter)

**FACCA S, LAHIRI D, FIORETTI F, MESSADEQ N, BENKIRANE-JESSEL N, AGARWAL A.** *In vivo* osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants. Journées Docscilor, Nancy, 23 juin 2011

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADFR : Activate-Depress-Free-Repeat  
BP : Binding Protein  
BPM : Bone Morphogenic Protein  
BSP : Bone Sialo Protein  
CFU-f : Unité Formant des Colonies de type fibroblastique  
CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses  
DA : Degré d'Acétylation  
DCM : DiChloroMéthane  
DCPD : Di Calcium Dihydrated  
DGL : DendriGraft poly-L-Lysine  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DMF : DiMéthylFormamide  
DPI : Double Polarisation Interférométrie  
E : module d'Elasticité ou module de Young  
EB : Embryoïd Bodies  
ES : Embryonic Stem cells  
FBS : Foetal Bovine Serum  
FC : Facteurs de Croissance  
FDA : Food and Drug Administration  
FGF : Fibroblast Growth Factors  
GAG : GlycosAminoGlycane  
GESTO : Groupe d'Etude des Greffes Et Substituts Tissulaires en Orthopédie  
GOD : Glucose OxyDase  
GH : Growth Hormone  
H : Hardeness  
HA : Hydroxyapatite  
HOb : Human Osteoblasts  
IGF : Insuline-Like Growth Factors  
INF : Interferon  
LP : Libération Prolongée  
MAPC : Multipotent Adult Progenitor Cells

M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor  
MEB : Microscopie Electronique à Balayage  
MEC : Matrice Extra-Cellulaire  
MES : 2-amino-2hydroxyméthyl-1,3-propanediol  
MET : Microscopie Electronique à Transmission  
MO : Microscopie Optique  
NTC : NanoTubes de Carbone  
RGD : séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp  
PBS : Phosphate-Buffered Saline  
PCL : Poly ε-CaproLactone  
PDGF : Platelet Derived Growth Factor  
PEI : Poly(éthylèneimine)  
PEM : Multicouches de Polyélectrolytres  
PGA : Acide Poly-Glutamique  
PLA : Acide PolyLactique  
PLL : Poly-(ℓ-Lysine) hydrobromide  
PM : Poids Moléculaire  
PMMA : PolyMéthyl-MéthAcrylate  
SBF : Sérum Bovin Foetal  
SG : Shot Gun  
SiRNA : Small interfering RNA  
SSI : Stress Stain Index  
SOFROT : Société Française de Recherche en chirurgie Orthopédique et Traumatologique  
TCP : Tri Calcium Phosphate  
TGF : Transforming Growth Factor  
TiCl<sub>4</sub> : Tétrachlorure de Titane  
TiO<sub>2</sub> : dioxyde de titane  
THM : Traitement Hormonal de la Ménopause  
TRIS : TRISHydroxyméthylaminométhane



## **INTRODUCTION GENERALE**

Les pathologies osseuses et ostéo-articulaires résultent souvent, soit d'un déséquilibre entre l'ostéof ormation et la résorption osseuse, soit d'une absence de régénération des tissus osseux ou cartilagineux. D'un point de vue tissu osseux, le chirurgien orthopédiste reste confronté dans sa pratique chirurgicale quotidienne à plusieurs pathologies : l'ostéoporose, le retard voire l'absence de consolidation d'une fracture (Fayaz *et al*, 2011) ou l'échec d'ostéointégration d'un implant. Les mécanismes physiopathologiques du déséquilibre de la balance entre ostéoblastes et ostéoclastes dans ces diverses pathologies restent encore partiellement non élucidés (Baron *et al*, 2001). D'autant plus que la régénération tissulaire osseuse est un processus complexe, qui fait intervenir une combinaison de facteurs biologiques (cellules et facteurs de croissance) (Obert *et al*, 2007) (Trojani *et al*, 2008), mais aussi de facteurs mécaniques (Basset *et al*, 1962) (Fukuda *et al*, 1967). D'un point de vue ostéo-articulaire, le chirurgien orthopédiste est confronté au problème d'absence de régénération spontanée du cartilage articulaire (Hunziker, 2002), suite à des lésions soit diffuses (dégénérescence arthrosique, une destruction infectieuse ou inflammatoire), soit localisées (traumatiques ou ostéo-chondrites) (Saw *et al*, 2011).

De nombreux matériaux fonctionnalisés visant l'induction de réponses cellulaires ou tissulaires spécifiques ont été développés, durant la dernière décennie. Ils sont fréquemment obtenus par modification de la surface du matériau à travers des voies aussi diverses que la physisorption, le greffage covalent ou le dépôt d'un film Langmuir-Blodgett (Preininger *et al*, 2000). Le but de ce travail a été d'utiliser les techniques de l'ingénierie osseuse et cartilagineuse pour améliorer ou créer des biomatériaux en les rendant bioactifs et vivants à une échelle nanométrique. L'ingénierie tissulaire a vu émerger dans la dernière décennie, différentes technologies concernant l'utilisation de nouveaux outils : facteurs de croissance et cellules souches. L'application de ces technologies est intéressante pour le remplacement d'un tissu au cas où les mécanismes de régénération sont insuffisants voire absents. Plus spécifiquement, l'ingénierie osseuse ou ostéo-articulaire, nous permet aujourd'hui de reconstruire un stock osseux ou cartilagineux, grâce à l'association de matrices, de facteurs ostéo-inducteurs et de cellules ostéogéniques ou chondrogéniques (Trojani *et al*, 2008).

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au développement de biomatériaux (naturels ou synthétiques), tridimensionnels (3D), implantables et utilisables pour le traitement de diverses pathologies de l'appareil locomoteur, qui sont capables d'induire une meilleure différenciation cellulaire et une régénération tissulaire plus stable.

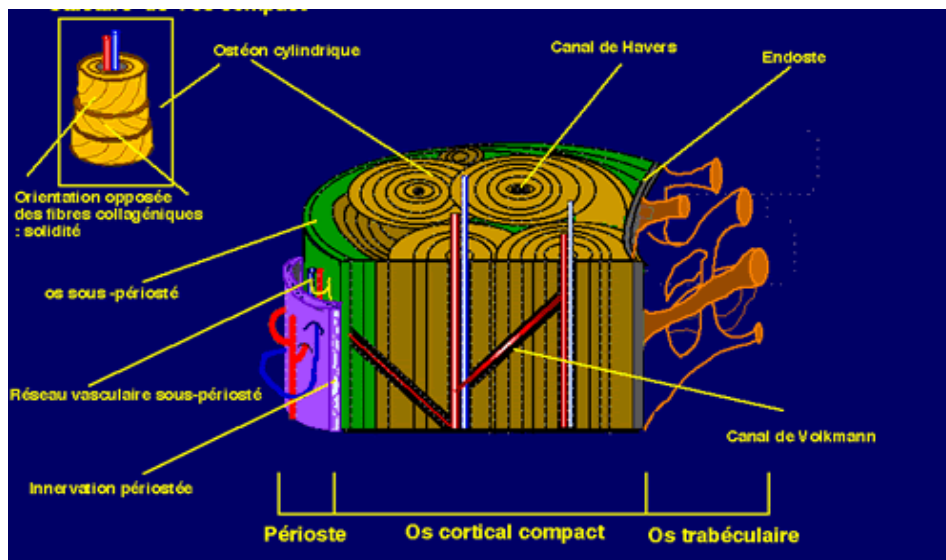
**CHAPITRE I : INTRODUCTION  
& ETAT DE L'ART**

# I - Le tissu osseux

## I.1 Définitions et classifications

D'un point de vue anatomique, il existe deux types d'os distincts :

- **un os cortical** ou **compact** (80% du stock osseux), retrouvé dans les diaphyses et les enveloppes des os plats et courts. Il est composé d'ostéons juxtaposés (Figure 1), dont les fibres de collagène sont orientées de façon à conférer des propriétés mécaniques de résistance. Chaque ostéon est centré sur un canal " de Havers " de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux, dits " de Volkmann " (Figure 2) : chaque canal est centré par un vaisseau innervé qui communique à la fois avec la vascularisation périostée et les vaisseaux de la moelle (Baron, 2001).



**Figure 1 : Structure de l'os compact ou cortical**

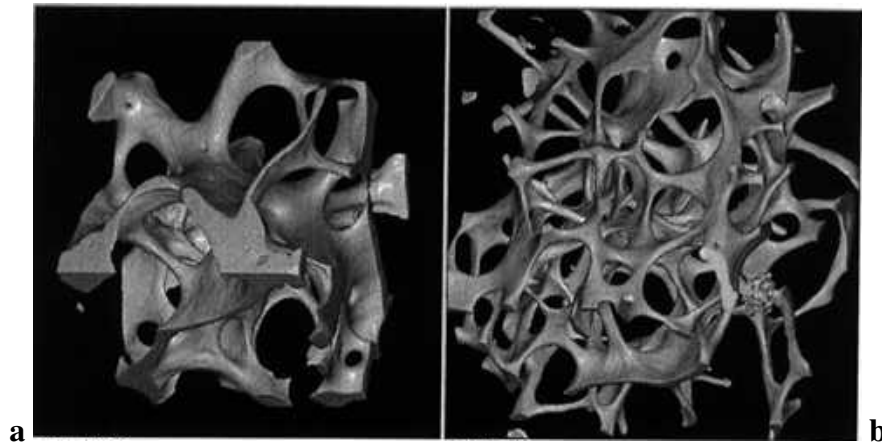
*L'os compact est structuré en ostéon, canal de Havers et canal de Volkmann (Baron, 2001)*



**Figure 2 : Jonction entre l'os cortical et l'os trabéculaire**

*En microscopie électronique à balayage, on visualise les canaux de Volkmann (Baron, 2001)*

- **un os spongieux** ou **trabéculaire**, présent dans les épiphyses et métaphyses des os longs et à l'intérieur des os plats et courts. Il a une fonction plus métabolique, mais sa résistance peut-être altérée en cas de pathologie osseuse. Il est constitué de plaques et de cylindres anastomosés (Figure 3). Les plaques organisées en 3D ont un rôle dans la résistance mécanique de l'os. Avec l'âge, les cylindres constituent les travées dont l'orientation dépend des lignes de forces mécaniques auxquelles est soumis l'os (Baron, 2001).



**Figure 3 : Echantillons d'os trabéculaire issus d'individus d'âge différent**

*Imagerie par synchrotron avec reconstruction 3D (Baron, 2001)*

*a : os d'un sujet jeune, anastomoses de travées en forme de plaques et de cylindres*

*b : os d'un sujet âgé, anastomoses en forme de cylindres*

D'un point de vue histologique, on distingue le tissu osseux primaire : premier tissu osseux formé destiné à être remplacé: il est de type fibreux et le tissu osseux lamellaire, qui se divise en trois types : tissu osseux haversien compact, tissu osseux haversien trabéculaire, et tissu osseux périosté. Le **périoste** joue un rôle fondamental dans la croissance en longueur et surtout circonférentielle des os. Chez l'enfant, il est constitué d'une couche superficielle fibreuse et d'une couche profonde contenant des cellules souches et des préostéoblastes. Dans cette couche profonde, on note d'épais faisceaux de fibres de collagène arciformes qui pénètrent profondément dans le tissu osseux (fibres de Sharpey). Au contact de l'os on trouve des ostéoblastes matures cuboïdes et de rares ostéoclastes et préostéoclastes. L'ensemble du périoste est richement vascularisé. Chez l'adulte, il est considéré comme quiescent à l'état physiologique. La couche fibreuse est peu différenciable de la couche profonde. Néanmoins, quelques cellules allongées ressemblant à des fibroblastes constituent des cellules souches susceptibles de se différencier sous l'influence de différents stimuli (stress mécanique, parathormone, fracture).

## 1.2 Les cellules osseuses

Au sein du tissu osseux, on retrouve deux types de lignées cellulaires assurant le remodelage osseux :

- **la lignée ostéoblastique**, composée de préostéoblastes, ostéoblastes, ostéocytes et de cellules dites bordantes. L'ostéoblaste (Figure 4) est une cellule d'origine mésenchymateuse, qui au bout de certaines divisions, va être capable de synthétiser la matrice extra-cellulaire (MEC), sa membrane est riche en phosphatase alcaline. Il exprime un facteur spécifique de transcription du gène *Cbfa1* (Boissy *et al*, 2000) (Harada *et al*, 1999). Les ostéoblastes forment un tapis de cellules jointives communiquant par des jonctions gap. Une fois la déposition de la MEC terminée l'ostéoblaste peut soit mourir par apoptose, soit devenir une cellule bordante aplatie sans activité métabolique, soit dans 20% des cas être emmuré dans la MEC minéralisée et devenir un ostéocyte. Les ostéocytes (Figure 5) sont situés dans des logettes ou ostéoplastes qui sont reliées par un réseau de canalicules dans lequel circule le fluide extracellulaire (Baron, 2001).

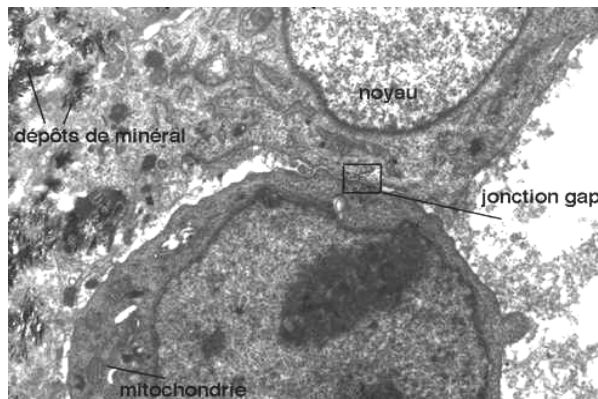


Figure 4 : Ostéoblaste en microscopie électronique à transmission (Baron, 2001)

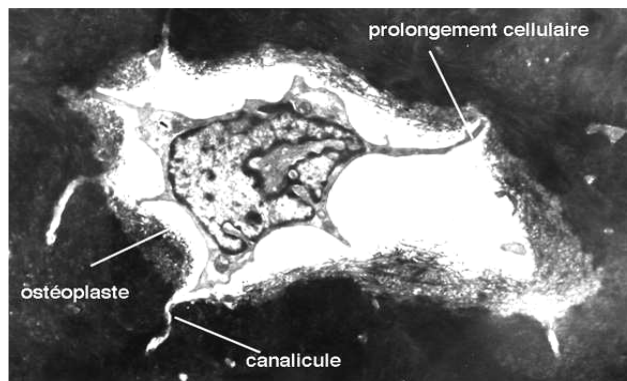
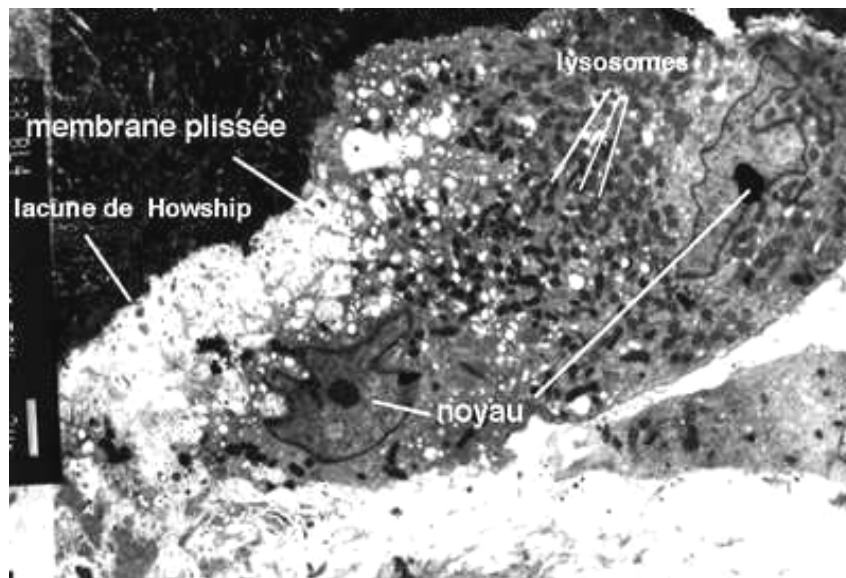


Figure 5 : Ostéocyte en microscopie électronique à transmission (Baron, 2001)

- **la lignée ostéoclastique**, comprend préostéoclastes et ostéoclastes, ce sont des cellules d'origine hématopoïétique provenant de cellules souches communes à la lignée monocytes-macrophages. La différenciation de prémonocytes en précurseurs ostéoclastiques se déroule dans la moelle osseuse sous l'action du M-CSF, du ligand du récepteur RANK et de son antagoniste l'ostéoprotégérine (Piedra *et al*, 2010). L'ostéoclaste (Figure 6) est une cellule multinucléée issue de la fusion des préostéoclastes. Il sécrète par sa bordure en brosse apicale entre autre des phosphatases acides, des métalloprotéases et des protons. Il lyse ainsi le tissu osseux, et se déplace sur les travées osseuses et à l'intérieur des lacunes de résorption qu'ils créent, appelées les " lacunes de Howship " .

L'ostéoclaste présente une activité cyclique alternant résorption (phases d'arrêt, d'attachement par des podosomes et de sécrétion d'enzymes par la zone de scellement) et migration (détachement des structures d'adhérences). L'interaction de l'ostéoplaste avec la MEC se fait par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines. La séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD) est alors reconnue par la portion extracellulaire des intégrines (Nakamura *et al*, 2004). Au sein de la MEC, le collagène de type I, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse II et la portion extra-cellulaire des intégrines contiennent le motif RGD et peuvent ainsi se lier aux intégrines (Baron, 2001).



**Figure 6 : Ostéoclaste en microscopie électronique à transmission (Baron, 2001)**

### ***1.3 La matrice extra-cellulaire osseuse***

La matrice extra-cellulaire (MEC) osseuse minéralisée synthétisée par les ostéoblastes est composée de :

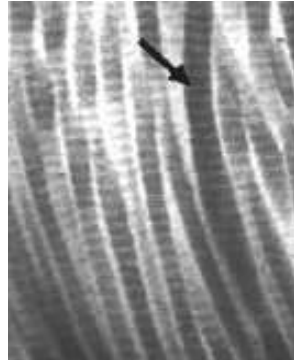
- substance fondamentale, composée d'acide hyaluronique, eau, sels minéraux comme les cristaux d'hydroxyapatite et les carbonates de calcium,
- fibres de collagène de type I, organisées en lamelles parallèles,
- glycoprotéines structurales non collagéniques, spécifiques ou non spécifiques de l'os.

- **l'hydroxyapatite**, est le principal minéral composant la MEC. Notre squelette contient 1110 à 1120 g de calcium et constitue la réserve en calcium de notre organisme. Ce calcium est très rapidement mobilisable grâce à l'activation des ostéoclastes par les hormones du métabolisme phospho-calcique comme la parathormone. La phase minérale est constituée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite de calcium de formule générale  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  qui ont la forme de petites aiguilles de 600 Å de longueur conférant à l'os sa solidité. Dans le cartilage et l'os tissé la calcification de la matrice se fait par l'intermédiaire des vésicules matricielles qui sont des vésicules émises par l'ostéoblaste ou le chondrocyte hypertrophique dans la matrice cartilagineuse et contenant de fortes concentrations de phosphatase alcaline et de minéraux. Dans le processus de minéralisation du tissu osseux lamellaire les vésicules matricielles n'ont jamais été visualisées. Les noyaux d'hydroxyapatite sont dans un premier temps localisés dans les lacunes des microfibrilles de collagène (phénomène de nucléation) où environ 70% du minéral est déposé. Puis, le cristal grossit (croissance cristalline) et comble l'espace disponible. Enfin, la calcification s'étend à l'espace interfibrillaire, cette dernière phase durant plus longtemps. L'interface entre matrice organique collagénique et matrice minérale est assurée par les protéines non collagéniques dont la composition favorise l'amorce du processus de nucléation.

- **le collagène**, est une glycoprotéine fibreuse rigide en forme de tresse à trois brins d'une longueur de 3000Å et de 50Å de diamètre, riche en proline et hydroxyproline. Le collagène est synthétisé sous la forme de tropocollagène (de 3000Å de long) constitué de trois sous unités deux chaînes alpha1 et une chaîne alpha 2. Cinq molécules de tropocollagène sont ensuite agencées en microfibrilles ordonnées séquentiellement en longueur avec une période de 640Å. Une fibrille est ensuite constituée par un assemblage régulier de microfibrilles de 100 à 300Å de diamètre visibles au microscope électronique sous la forme d'une alternance de



bandes sombres et de bandes claires (Figure 7). Enfin la fibre collagénique est un agrégat de fibrilles en forme de ruban visible au microscope optique. Dans l'os lamellaire la matrice organique est déposée de façon très organisée conduisant à la juxtaposition de lamelles parallèles biréfringentes lorsque l'on regarde au microscope les coupes osseuses en lumière polarisée. Cet aspect lamellaire est lié au fait que les fibres de collagène sont alternativement déposées sous forme dense puis sous forme lâche.



**Figure 7 : Fibres de collagène de type I de la matrice extra-cellulaire**  
*Les fibres de collagène I sont visualisées en microscopie électronique à transmission (MET)*  
*(Facca, 2010)*

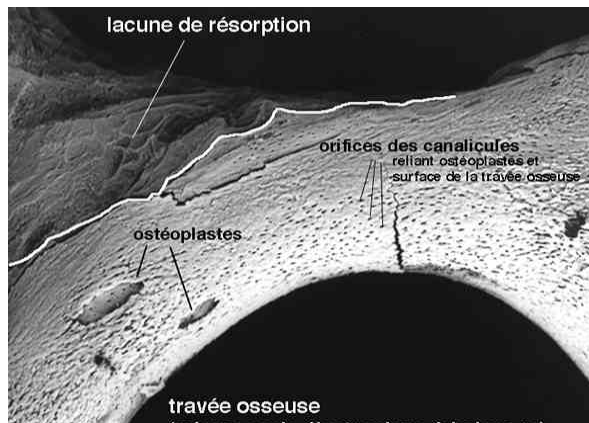
- **les protéines non collagéniques** représentent 10% à 15% du contenu protéique osseux, dont un quart provient de la circulation sanguine et est stocké dans l'os. La glycoprotéine la plus abondante est l'**ostéonectine**. Une autre glycoprotéine spécifique du tissu osseux est l'**ostéocalcine**, qui a une grande affinité pour l'hydroxyapatite et dont la fonction serait d'inhiber la formation osseuse. Une partie de l'ostéocalcine synthétisée par les ostéoblastes passe dans la circulation sanguine, elle peut être dosée comme marqueur de la fonction de formation ostéoblastique. La gla-protéine matricielle est présente dans la matrice osseuse mais n'est pas spécifique de l'os, car elle se trouve aussi dans la paroi des vaisseaux où elle joue un rôle d'inhibition de la calcification vasculaire. On retrouve aussi dans la MEC, les sialoprotéines dont l'**ostéopontine** et la BSP (Bone Sialo Protein). Leurs fonctions restent encore mal connues. L'ostéopontine permettrait l'adhésion des ostéoclastes sur la travée osseuse. Il existe également d'autres protéines d'adhésion, la **thrombospondine** et la **fibronectine**. Enfin, les derniers constituant sont les protéoglycanes avec les glycosaminoglycanes (chondroïtine sulfate, héparane sulfate), et la décorine et le biglycan (Urist, 1980) qui jouent un rôle dans l'agencement des molécules de collagène lors de leur organisation secondaire et tertiaire.

#### ***I.4 Physiologie du remodelage osseux et ostéogénèse***

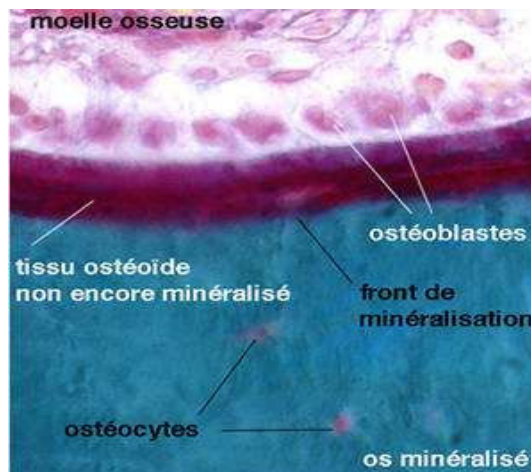
Dans l'os compact comme spongieux, il existe un renouvellement constant aussi appelé remodelage osseux. L'observation du tissu osseux a permis de constater l'existence d'unités fonctionnelles de remodelage constituées de deux types cellulaires travaillant étroitement : **les ostéoclastes et les ostéoblastes**. Le résultat de ce travail (respectivement résorption puis formation) au sein d'une unité fonctionnelle de remodelage constitue une unité structurale ou ostéon. Un cycle de remodelage dure 4 mois chez l'adulte, la phase de formation est plus longue que la phase de résorption.

Mais ces unités sont mobiles et ne sont pas synchrones, elles s'adaptent aux facteurs locaux ou systémiques comme le taux de parathormone ou de vitamine D. Ainsi, au cours du remodelage se succèdent quatre phases :

- (i) **une phase d'activation**, le long d'une travée osseuse inactive surviennent les précurseurs des lignées ostéoclastiques,
- (ii) **une phase de résorption**, l'ostéoclaste différencié est responsable du phénomène d'ostéoclasie et forme des lacunes de résorption (Figure 8). Il entraîne une résorption osseuse par diminution du pH (pompe à protons) au contact de la MEC : l'acidité favorise la dissolution du cristal d'hydroxyapatite et l'activation de la synthèse d'enzymes protéolytiques,
- (iii) **une phase d'inversion**, où les ostéoclastes sont remplacés par des macrophages qui lissent le fond des lacunes,
- (iv) **une phase de formation**, les ostéoblastes recrutés vont combler la lacune en synthétisant du tissu osseux immature ou ostéoïde et permettre secondairement sa cristallisation. Il existe alors un front de minéralisation (Figure 9). Les ostéoblastes synthétisent des facteurs de croissance et des enzymes (comme la phosphatase alcaline qui hydrolyse les inhibiteurs de la minéralisation) pour entretenir la calcification du tissu osseux (Baron, 2001).



**Figure 8 : Visualisation d'une lacune de résorption et d'une travée osseuse**  
*Visualisées en microscopie électronique à balayage (MEB) (Baron, 2001)*



**Figure 9 : Front de minéralisation en microscopie optique (Baron, 2001)**

L'ostéoblaste est responsable du **phénomène d'ostéogénèse** qui se déroule en trois principales phases (Urist, 1980) :

- (i) la phase de prolifération avec synthèse de collagène de type I et d'ostéonectine,
- (ii) la phase de déposition-maturation de la MEC avec expression de la phosphatase alcaline et d'ostéopontine,
- (iii) la phase de minéralisation avec expression de BSP et d'ostéocalcine.

L'activité d'ostéoclasie est nécessaire au bon maintien de la solidité osseuse. Il existe une balance ostéoblastes-ostéoclastes. Les cellules de la lignée ostéoblastique jouent un rôle important dans le contrôle du remodelage osseux, par leur capacité à synthétiser des facteurs de croissance et en tant que cellules cibles des hormones contrôlant la différenciation des ostéoclastes. En effet, l'ostéoblaste par le biais de son action sur l'ostéoclaste, en sécrétant une protéine RANK ligand, joue un rôle également dans la résorption osseuse (les ostéoblastes sont nécessaires à la différenciation des ostéoclastes).

## II - Le tissu cartilagineux

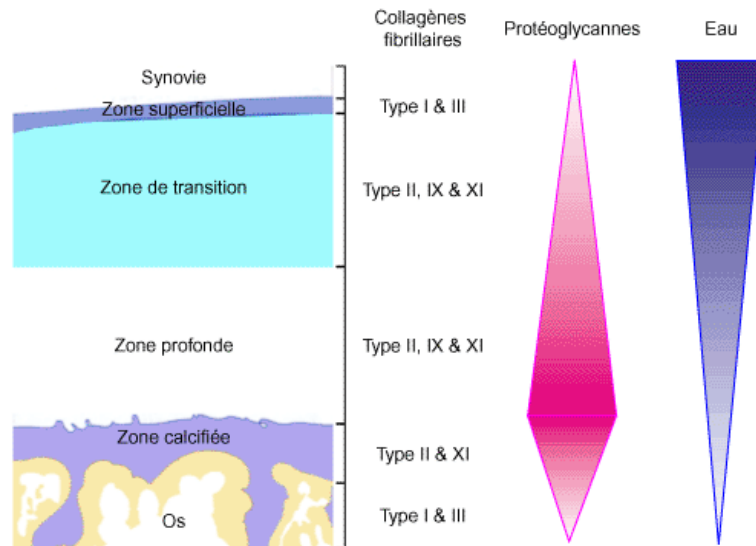
### II.1 Définitions et classifications

Le cartilage est un tissu conjonctif spécialisé formé par des cellules : les chondrocytes, incluses dans des logettes, aussi nommées chondroplastes, au sein d'une MEC composée de glycosaminoglycanes et de collagène. On retrouve 3 types de tissus cartilagineux dans le corps humain, qui diffèrent dans les quantités relatives de ces trois composantes principales : le **cartilage hyalin** (articulaire ou non), le **cartilage fibreux** ou fibrocartilage (ménisques, disques intervertébraux), et le **cartilage élastique** (oreille externe).

• **le cartilage hyalin extra-articulaire** joue un rôle important durant le développement embryonnaire du système musculo-squelettique chez les mammifères. Il apparaît transitoirement avec les chondrocytes qui vont se différencier en chondrocytes hypertrophiques qui vont être au final remplacés par du tissu osseux : c'est l'ossification enchondrale. Mais la totalité du cartilage hyalin n'est pas transitoire, il va persister au niveau de la trachée, du larynx, du nez par exemple, c'est le cartilage hyalin non articulaire. À la naissance, certains os sont constitués en partie de ce type de cartilage. Puis, au fur et à mesure des années, sa proportion dans l'os diminue ; à la puberté il ne reste plus que les cartilages de conjugaison au niveau des os longs, qui vont disparaître à la fin de la croissance.

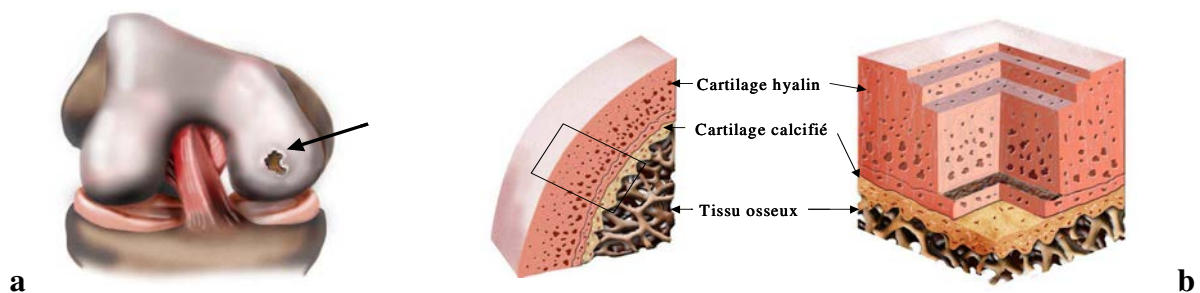
• **le cartilage hyalin articulaire** joue le rôle de couche protectrice sur la surface de l'os. Il se divise en 4 zones de compositions différentes (Figure 10), (Figure 11 b) :

- (i) la zone superficielle : 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage, qui est recouverte de la synoviale articulaire,
- (ii) la zone de transition : 40 à 45 % de l'épaisseur du cartilage,
- (iii) la zone profonde : 40 à 45 % de l'épaisseur du cartilage,
- (iv) la zone calcifiée : 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage.



**Figure 10 : Représentation du cartilage articulaire adulte selon Pujol (Pujol, 1995)**

Le cartilage permet d'amortir les chocs subis par le squelette. L'architecture du cartilage articulaire lui confère des propriétés mécaniques de résistance en compression, en cisaillement et par son faible coefficient de frottement, permet une répartition du poids dans les joints articulaire induisant une absorption des chocs. De fait, le cartilage articulaire subit des mouvements générateurs d'usure et des contraintes mécaniques importantes. Ses propriétés mécaniques sont intermédiaires entre l'os et du tissu conjonctif dense comme le tendon. Or, ce tissu à l'âge adulte n'a plus de capacités de régénération. Ceci explique qu'un nombre important de pathologies articulaires, quand elles intéressent la moitié ou la totalité de la surface cartilagineuse ne sont traitées actuellement que par la mise en place de prothèses articulaires.



**Figure 11 : Représentation du cartilage au niveau d'articulation du genou**

a) lésion partielle de la surface cartilagineuse d'un condyle fémoral

b) structure normale du cartilage articulaire

## II.2 Les chondrocytes et leur matrice extra-articulaire

Le cartilage articulaire se divise en 2 zones :

- **la substance territoriale ou globe chondroïque**, qui désigne la partie cellulaire du cartilage. Les chondrocytes peuvent être isolés ou former des petits groupes isogéniques (des chondrons) issus de divisions d'un chondrocyte déjà isolé. Cet isolement progressif est dû à la production sur toute la surface des chondroblastes (ou cellules précurseurs qui une fois isolées ou en petits groupes isogéniques, sont appelées chondrocytes) de la MEC.

- **la substance intercellulaire ou matrice cartilagineuse**, qui est produite par les chondrocytes. C'est la partie acellulaire du cartilage, constituée de glycosaminoglycanes, de collagène (fibres de type I et de type II), de chondronectine, de fibromoduline, etc... La substance intercellulaire située à proximité des chondroblastes a des propriétés basophiles, c'est la capsule. Elle est riche en chondroïtine 4-sulfate, en chondroïtine 6-sulfate, en kératane sulfate, mais pauvre en collagène.

La MEC articulaire abondante est synthétisée par les chondrocytes (volumineuses cellules de forme arrondie). Les fibres de collagène de type II et XI forment un réseau à larges mailles (Figure 12).



**Figure 12 : Schéma d'un chondrocyte**

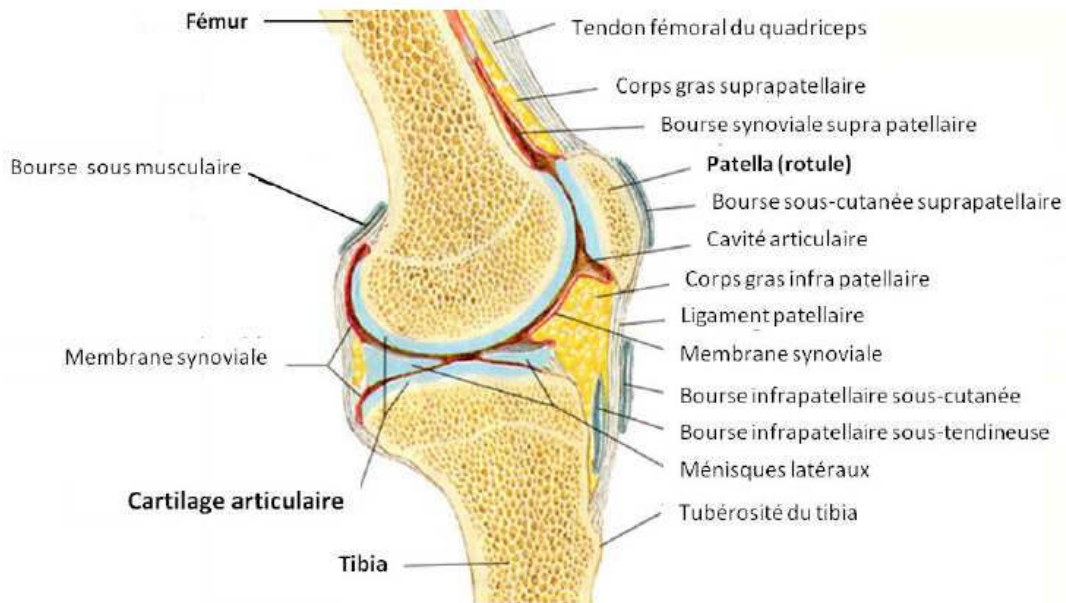
*Le chondrocyte produit des fibres de collagène sous forme de micro-filaments (1) qui s'assemblent ensuite sous forme de grosses fibres de collagène mature (2) pour former un réseau à larges mailles*

La vascularisation et l'innervation du cartilage sont inexistantes : le chondrocyte se nourrit par imbibition à partir de l'os sous chondral. Contrairement à d'autres tissus conjonctifs, le cartilage ne contient pas de vaisseaux sanguins. Les chondrocytes sont nourris par diffusion, aidé par l'action de pompage engendrée par la compression du cartilage articulaire. Ceci explique que par rapport à d'autres tissus conjonctifs, le cartilage se développe et se répare plus lentement. C'est la membrane articulaire ou membrane synoviale (Figure 13), qui va sécréter le liquide articulaire appelé aussi liquide synovial, qui "lubrifie" l'articulation et qui nourrit ainsi le cartilage. En fait, la stabilité d'une articulation est assurée par une capsule (Figure 13), qui constitue une sorte de sac dont la partie interne est tapissée par cette membrane synoviale.

Le chondrocyte sécrète les molécules de la substance intercellulaire, des cytokines, des enzymes capables de dégrader la matrice. Il présente des récepteurs hormonaux à des hormones de croissance hypophysaire, à la thyroxine, à la testostérone et à d'autres hormones sexuelles. Les mécanismes physiologiques assurant la régulation de la synthèse de la MEC des chondrocytes sont influencés par deux types de relation : d'une part, les relations dites physiques entre les chondrocytes et les contraintes subies et d'autre part les relations dites biologiques, qui représentent le contrôle de la MEC sur sa propre biosynthèse par les chondrocytes. Mais les deux mécanismes sont interconnectés.

Le cartilage possède les propriétés physiques nécessaires à la résistance mécanique aux forces de compression et à la réalisation des mouvements. Cela suppose, plus particulièrement, une résistance importante à l'usure et donc une limitation des frottements. La MEC remplit l'ensemble de ces fonctions. Comme la matrice absorbe les forces de compression, il est admis que ces contraintes ont un effet sur les activités de synthèse des chondrocytes. Ces forces seraient absorbées par les protéoglycanes, comme l'agrécan, qui peuvent former des complexes d'une taille très importante (de plusieurs millions de Dalton) avec l'acide hyaluronique. Chargés négativement, ces agrégats fixent un nombre important de molécules d'eau assurant la capacité d'amortisseur des chocs. Ainsi le système squelettique possède des mécanismes de réaction aux contraintes et aux déformations de la matrice. Il est important de noter que les synthèses réalisées par les chondrocytes sont influencées par les forces de compression *in vitro*. Il paraît donc possible qu'*in vivo* les contraintes interviennent sur le maintien du phénotype des chondrocytes.





**Figure 13 : Coupe transversale d'une articulation de genou**

L'articulation est entourée d'une membrane synoviale qui entoure les cartilages articulaires (<http://www.arthrodedugenou.com>)

### ***II.3 L'os sous-chondral***

Biomécaniquement, l'os sous-chondral constitue une zone de transition entre le tissu cartilagineux et l'os trabéculaire. Il joue ainsi un rôle primordial dans l'amortissement des chocs en minimisant le stress mécanique du tissu cartilagineux (50% de l'amortissement articulaire). Il permet au même titre que le cartilage calcifié de transformer les forces de cisaillement en des forces de pression. L'os sous-chondral est similaire à un os lamellaire tout en étant moins rigide. Sa force et sa rigidité croissent exponentiellement avec la densité du contenu minéral. L'épaisseur de l'os sous-chondral varie entre 0,1 et 2 mm et peut atteindre jusqu'à 3 mm dans les régions à fortes contraintes mécaniques (plateau tibial). Cette épaisseur varie d'une espèce à une autre, en fonction de l'âge, du poids, et de la localisation au sein même d'une articulation.

Contrairement au tissu cartilagineux, l'os sous-chondral est innervé et vascularisé. Si la vascularisation de l'os sous-chondral semble jouer un rôle nutritif pour les couches profondes du cartilage et pendant la croissance, il est en revanche absent chez l'adulte. Le remodelage de l'os sous-chondral diminue en cas d'activité physique et dans les zones à fortes contraintes mécaniques.



### III - Les principales pathologies osseuses et ostéo-articulaires

#### III.1 L'ostéoporose

Le mot ostéoporose apparaît vers 1820 avec l'anatomo-pathologiste strasbourgeois JG Lobstein (1777-1835) connu surtout pour la maladie qui porte son nom : l'ostéogénèse imparfaite. Il crée le terme « ostéoporose » qui signifie littéralement amincissement des os : « ostéo » qui a trait à l'os, et « porose » qui signifie amincissement ou porosité. Cette maladie alors nouvelle de l'os, véritable « désossification », s'oppose à la maladie décrite par J.L Petit correspondant à une « décalcification ». C'est à partir de 1980 avec l'apparition de la densitométrie, en particulier biphotonique, que l'ostéoporose rentre dans sa période dite densitométrique, où la maladie peut être diagnostiquée bien avant qu'elle ne se complique et donne lieu à un traitement préventif en fonction du T-score (Tableau 1).

**Tableau 1 : Diagnostic densitométrique d'ostéoporose chez les femmes ménopausées**

T-score densitométrique	Fracture ostéoporotique	Conclusion
T-score > 1	non	normalité
-2,5 < T-score < -1	non	ostéopénie
T-score < -2,5	non	ostéoporose
T-score < 2,5	oui	ostéoporose sévère

L'ostéoporose est une maladie du squelette, qui se manifeste par une déperdition osseuse progressive au cours de laquelle les os s'atrophient, deviennent fragiles et risquent de se fracturer facilement (augmentation du seuil fracturaire). La masse osseuse globale est représentée globalement par 80% de tissu osseux cortical et 20% de tissu osseux trabéculaire. La compétence biomécanique d'un os, c'est à dire sa capacité à résister à des contraintes dépend, d'une part d'un facteur quantitatif et d'autre part d'autres facteurs eux qualitatifs. Le facteur quantitatif est la masse osseuse corticale et trabéculaire disponible qui peut être mesurée par l'ostéodensitométrie. Les facteurs qualitatifs, sont représentés par la proportion entre os cortical et os trabéculaire, l'anatomie de la pièce osseuse (longueur, surface), la qualité de la microarchitecture osseuse trabéculaire, le niveau de l'activité du remodelage osseux, le degré de minéralisation osseuse et la qualité du collagène osseux. On comprend ainsi que la survenue d'une fracture va dépendre à la fois de ces facteurs intrinsèques osseux quantitatifs et qualitatifs, et à la fois d'autres facteurs extrinsèques (type risque de chute et troubles de l'équilibre) (Legrand *et al*, 2006).

L'ostéoporose connaît une évolution au cours des dernières années, tant sur la connaissance de ses mécanismes physiopathologiques, que sur sa définition, ses moyens diagnostics ou encore ses conséquences thérapeutiques. Lors de la conférence internationale de consensus de Hong Kong en 1993, l'ostéoporose a été définie comme une affection diffuse du squelette, caractérisée par une masse osseuse basse et des altérations micro-architecturales du tissu osseux, conduisant à une augmentation de la fragilité osseuse et à un risque accru de fractures. En 2001, l'ostéoporose se redéfinit comme une maladie généralisée du squelette par diminution de la masse osseuse associée par ailleurs à des altérations de la qualité osseuse (Nhi, 2001). Ces altérations correspondent à des troubles de la micro-architecture, mais aussi à des anomalies du remodelage osseux, des troubles de la minéralisation et à l'existence de microfissures. La définition de l'ostéoporose par l'OMS, s'effectue en fonction du T-score (Tableau 1) selon Legrand (Legrand *et al*, 2006).

Si le pic de masse osseuse est atteint à 25 ans, c'est à partir de 40 ans que la perte osseuse démarre à raison de 3% par décade. Chez la femme, immédiatement après la ménopause, le remodelage s'accélère au profit de la résorption avec 2% par an, avec dans 25% une perte osseuse rapide pouvant atteindre les 6% annuels (Legrand *et al*, 2006). Puis dans les deux sexes, après 60 ans, la perte osseuse décroît parallèlement et lentement, jusqu'à 75 ans. Une seconde phase de perte osseuse rapide, préférentiellement au col fémoral s'amorce avec 0,9% par an. Le seuil choisi par l'OMS, soit un T-score inférieur à -2,5, permet de classer environ 30% des femmes ménopausées comme ostéoporotiques (Legrand *et al*, 2006).

On distingue : l'ostéoporose primitive ou « ostéoporose commune », post-ménopausique, affection oestrogénodépendante connue depuis 1941, l'ostéoporose sénile affectant les individus de plus de 70 ans le plus souvent de sexe masculin, l'ostéoporose idiopathique du sujet jeune et l'ostéoporose secondaire consécutive à une autre maladie ou à des circonstances particulières : problèmes endocriniens (syndrome de Cushing, hyperthyroïdie, hyperparathyroïdie, hypogonadisme, ménopause précoce), problèmes digestifs (anorexie mentale, dénutrition, syndrome de malabsorption, malabsorption chronique, intoxication alcoolique), problèmes osseux (immobilisation prolongée, ostéogenèse imparfaite) et traitements prolongés (corticothérapie, hormones thyroïdiennes, chimiothérapie, anti-aromatases, anti-androgènes). L'ostéoporose masculine est bien une réalité clinique. Parmi 100 hommes âgés de plus de 50 ans, 18 présenteront avant la fin de

leur vie une fracture par fragilité osseuse (Legrand *et al*, 2006). Certes moins fréquente que l'ostéoporose ménopausique, sa prévalence n'est pas négligeable, car en terme de fracture elle représente 13% chez les hommes de plus de 50 ans, contre 39% chez les femmes de plus de 50 ans (Cortet, 2006). Dans la population masculine, l'intérêt du dépistage par ostéodensitométrie n'est pas dénué d'intérêt, après avoir éliminé au préalable les causes d'ostéoporose secondaire. En effet, dans cette population les ostéoporoses secondaires représentent 50% des cas d'ostéoporose masculine. Le seuil interventionnel chez les hommes de plus de 50 ans est un T-score supérieur à -2,5. Ce seuil au niveau du fémur masculin triple leur risque fracturaire (Roos *et al*, 1996).

Le vieillissement progressif de la population va entraîner inexorablement une augmentation de l'incidence et de la prévalence des fractures ostéoporotiques, qui sont les indicateurs les plus parlant et représentatifs de la maladie ostéoporotique. D'un point de vue santé publique, l'ostéoporose représente une véritable pandémie. Parmi 100 femmes ménopausées en France, 40 présenteront au moins une fracture ostéoporotique dans leur vie (Legrand *et al*, 2006). Les os les plus fréquemment touchés sont le col du fémur, le radius distal et les vertèbres. Il est d'ailleurs actuellement reconnu qu'en plus de ces 3 sites de prédilection, l'ostéoporose est responsable des fractures du bassin, des côtes, de la cheville et du col huméral chez les personnes âgées. L'incidence des fractures ostéoporotiques est faible dans la première décennie post-ménopausique, puis croît avec les années.

Devant cette incidence croissante, il faut d'une part évaluer le risque individuel de survenue des fractures ostéoporotiques et identifier les populations à risque pour les traiter préventivement contre l'ostéoporose et d'autre part bien sûr développer des traitements des fractures ostéoporotiques par des biomatériaux actifs si possibles injectables et résorbables.

### ***III.2 L'arthrose***

Le rôle du vieillissement dans la survenue de l'arthrose n'est pas primordial. Il joue certes un rôle en rendant le cartilage moins apte à résister aux agressions, mais à lui seul il ne peut pas déclencher une arthrose. L'arthrose est un processus pathologique à part entière, fait de processus de destruction et de processus de réparation. En fait, c'est en réponse à cet excès de pression sur le cartilage que le processus arthrosique va se déclencher.

Deux types de réaction sont alors observés :

- (i) **une réaction mécanique** : l'hyperpression va induire une rupture du réseau de collagène et un oedème du cartilage qui devient alors plus fragile, se fissure et s'ulcère. Le cartilage finit par s'amincir puis par se fragmenter.
- (ii) **une réaction biologique** : sous l'effet de l'hyperpression, les chondrocytes deviennent hyperactifs et secrètent davantage de protéoglycanes et de collagène, mais aussi davantage d'enzymes de destruction. On constate une augmentation générale du métabolisme, d'abord en faveur de la synthèse (tentative de réparation du cartilage), puis en faveur de la destruction. Les chondrocytes finissent par s'épuiser et par mourir.

Si le cartilage est le premier atteint au cours de l'arthrose, les autres éléments de l'articulation vont également être touchés. Ainsi la **membrane synoviale** va chercher à lyser les fragments de cartilage libres dans la cavité articulaire. Elle va réagir par une inflammation qui peut se traduire par un épanchement synovial. Quant à **l'os sous-chondral**, il va s'épaissir en réaction à cet excès de pression et produire une collerette osseuse en périphérie de l'articulation (Figure 14). Cette prolifération d'os néo-formé s'appelle **l'ostéophyte**. Cet épaississement et les ostéophytes se voient sur les radiographies (Figure 14).

La dégénérescence arthrosique est due à une **hyperpression** (absolue ou relative) sur l'articulation et donc sur le cartilage. On différencie deux mécanismes d'arthrose, qui peuvent d'ailleurs co-exister chez la même personne :

(i) **l'arthrose mécanique** : un excès de pression s'exerce sur un cartilage normal. A la longue, ce cartilage ne peut plus assumer cette hyperpression absolue, finit par dégénérer et l'arthrose s'installe. Les causes sont : les surcharges pondérale (obésité), professionnelle (port fréquent et répété de charges lourdes), sportive (idem), le surmenage articulaire (microtraumatismes) et une articulation travaillant dans de mauvaises conditions bio-mécaniques du fait d'une anomalie anatomique (souvent congénitale comme la dysplasie) ou d'une séquelle de traumatisme (fracture articulaire). Dans tous ces cas, les pressions au sein de l'articulation ne sont pas ou plus normalement réparties, elles sont trop fortes en certains points, trop faibles en d'autres. Ce sont les zones d'hyperpression qui vont dégénérer vers une arthrose.

(ii) **l'arthrose structurale** : dans ce cas de figure la pression est normale mais elle s'exerce sur un cartilage fragile. Pour ce cartilage moins résistant, la pression pourtant normale est encore trop importante (hyperpression relative) et il va réagir en dégénéralant vers l'arthrose. Toutes les maladies qui fragilisent directement ou indirectement la structure du cartilage articulaire vont induire de telles arthroses. Ce sont :

- les maladies qui touchent directement le cartilage : chondrocalcinose (dépôts de calcium dans le cartilage), ochronose (ou alcaptonurie état secondaire à un déficit en acide homogentisique-oxydase, caractérisée par l'apparition d'une arthrose vertébrale et des grosses articulations et de pigmentations cutanées prédominant sur les zones cartilagineuses de teinte gris bleu), anomalies génétiques qui fragilisent les composants du cartilage (protéoglycans ou collagène).
- les maladies qui touchent d'autres tissus de l'articulation et qui retentiront indirectement sur le cartilage : maladies de l'os sous-chondral (ostéonécrose), maladies de la membrane synoviale (infection articulaire, maladies inflammatoires de la synoviale comme la polyarthrite rhumatoïde).



**Figure 14 : Arthrose de l'articulation trapézo-métacarpienne**

*On visualise un ostéophyte, un pincement de l'interligne articulaire et une sclérose de l'os sous-chondral*

En revanche, dans la maladie arthrosique, le remodelage osseux s'accélère avec une ostéoformation qui augmenterait au cours de la phase précoce de la maladie arthrosique pour diminuer ensuite à un stade plus avancé. L'augmentation du « turn-over » au cours des phases

précoces, entraînerait une augmentation d'os ostéoïde et une réduction de la minéralisation osseuse qui favoriseraient la diminution du module élastique. En raison de cette étroite relation existant entre la fragilisation du cartilage et de l'os sous-chondral au cours du processus de vieillissement, certains auteurs ont suggéré la possibilité à l'os sous chondral d'initier la destruction du cartilage. Cette théorie proposée par Radin (Radin *et al*, 1986) repose sur une densification inhomogène de l'os sous-chondral au sein d'une articulation qui fragiliserait le tissu cartilagineux. Les forces de pression ainsi exercées sont moins bien amorties là où l'épaisseur de l'os sous chondral est plus faible, exposant davantage le cartilage aux forces de cisaillement. L'hypersollicitation de l'articulation aboutit à la formation de fissures qui atteignent toute l'épaisseur du cartilage. La poursuite des activités et l'absence de réparation favorisent la formation de lésion focale avec mise à nu de l'os sous chondral. Cependant cette théorie n'a pas été validée par certains modèles expérimentaux ainsi que par des modèles *ex vivo* de modélisation. Felson (Felson *et al*, 2002), a montré qu'un oedème osseux trabéculaire pouvait jouer un rôle dans l'aggravation des lésions du cartilage. Cet oedème osseux correspondrait soit à des phénomènes fissuraires soit encore à des phénomènes nécrotiques.

## **IV - Les traitements**

### ***IV.1 Les traitements médicamenteux***

Les maladies du squelette osseux résultent souvent d'un déséquilibre entre ostéoformation et résorption osseuse, celles du cartilage d'une absence de régénération du tissu ostéo-articulaire. Induire et stimuler la régénération osseuse et cartilagineuse reste un défi pour le rhumatologue et le chirurgien orthopédiste confronté dans leur pratique quotidienne à l'ostéoporose, la lyse tumorale ou la destruction articulaire. Mais quand est-il du traitement médical avant d'envisager la solution chirurgicale dans l'ostéoporose fracturaire ou l'arthrose évoluée ?

Afin de freiner l'**ostéoporose**, il existe actuellement les moyens non-médicamenteux et les moyens médicamenteux. L'efficacité d'un traitement de l'ostéoporose post-ménopausique est jugée sur deux critères, l'augmentation de la résistance mécanique osseuse et la réduction du risque fracturaire (Thomas *et al*, 2006). Plusieurs classes thérapeutiques

répondent actuellement à ces critères d'efficacité, le traitement hormonal substitutif, les apports vitamino-calciques, et suite à des progrès récents, deux groupes d'antiostéoporotiques : les agents anticataboliques ou antirésorptifs et les agents anaboliques. Actuellement ces derniers traitements réduisent le risque de fracture de 30 à 65%. Leur prise repose sur le concept « **ADFR** » d'Harold Frost (Frost, 1984) : **Activate-Depress-Free-Repeat**. Il a pour but de : séquencer le traitement pour activer les cellules osseuses (*Activation pulse*) et le remodelage, inhiber ensuite les ostéoclastes (*the drug Depresses the resorption phase*), laisser une période libre (final formation is *Free of any drug*) pour la minéralisation et de répéter cette séquence (*Repeating*) (Thomas *et al*, 2006). Le but est de diminuer l'incidence de la première fracture avec un traitement de 5 à 10 ans.

Parmi les divers traitements de l'ostéoporose, on dénombre :

(i) Le traitement hormonal de la ménopause (THM), ne répond plus à l'indication du traitement de l'ostéoporose, que dans certains cas bien précis. Les études anglo-saxonnes réalisées ont permis de conclure à un effet bénéfice-risque défavorable pour les femmes ménopausées. Néanmoins, elles considèrent un effet favorable si le THM est utilisé sur un court terme chez les femmes avec un syndrome climatérique ou un risque fracturaire (Ribot, 2006). D'ailleurs, le THM est le seul traitement en terme d'épargne fracturaire, dont le bénéfice est démontré chez les femmes entre 50 et 60 ans. Son indication doit donc être reconsidérée pour les femmes à risque fracturaire osseux. La perte osseuse débute dès les dernières années de la périménopause, puis le tissu osseux modifie rapidement sa structure dès le début de la phase post-ménopausique. Les biopsies ou analyses osseuses par IRM ont retrouvé une augmentation de l'érosion osseuse, une diminution de l'épaisseur des travées osseuses, ou de la densité volumétrique, significatives entre les femmes sans THM et celles avec. Le THM est donc efficace au début de la phase post-ménopausique, notamment chez les femmes à risque osseux, et est indiqué chez les femmes de moins de 60 ans d'autant plus qu'elles présentent des bouffées de chaleur.

(ii) La vitamine D qui est plus exactement une prohormone, quelle soit synthétisée par la peau sous l'action des UVB ou apportée par l'alimentation, elle est hydroxylée par le foie en 25 hydroxy-vitamine D, avant d'être hydroxylée par le rein en calcitriol. Une insuffisance en vitamine D, entraîne une diminution de l'absorption intestinale du calcium et une hypocalcémie, elle-même à l'origine d'une hyperparathyroïdie secondaire qui stimule le remodelage osseux. Un déficit en vitamine D peut aggraver l'effet hypocalcémiant de certains

médicaments tels les biphosphonates. La mesure du taux sanguin de la 25 OHD (75 nmol/L) reflète le stock de la vitamine D de l'organisme pour dépister une insuffisance en vitamine D. Cette insuffisance est fréquente chez 59 % des plus de 60 ans et associée à une augmentation du risque de fractures ostéoporotiques chez le sujet âgé selon Cormier (Cormier, 2006). La supplémentation en vitamine D, a deux effets, elle réduit l'hyperparathyroïdie secondaire, ce qui va diminuer les phénomènes de remodelage osseux et est associée à une diminution du risque de chutes chez les sujets âgés (Deprez, 2006).

(iii) Le calcium qui une fois ingéré n'est absorbé qu'autour d'un pourcentage de 20 à 30 %. Les femmes ménopausées n'ont bien souvent qu'un apport journalier inférieur à 600 mg/jour, ce qui induit une stimulation de la sécrétion de la parathormone et un remodelage osseux. Le risque de fracture de l'extrémité supérieure du fémur est inversement proportionnel à l'apport calcique, d'où l'effet bénéfique d'une supplémentation orale (Cortet, 2006). En prévention primaire de fracture, l'apport vitamino-calcique n'apporte qu'un bénéfice modeste, et en prévention secondaire il n'existe pas de preuve d'épargne fracturaire. Néanmoins, la correction du déficit est nécessaire et doit être poursuivie à vie chez les sujets institutionnalisés de plus de 80 ans pour ne pas perdre les gains antérieurs (Cortet, 2006) (Deprez, 2006) et chez ces sujets, elle a démontré son efficacité antifracturaire. Il ne s'agit pas toujours d'un traitement antifracturaire à proprement parler mais d'un traitement indispensable pour traiter les carences.

(iv) Les agents antirésorptifs (les bisphosphonates, les selective estrogen receptor modulators (SERMs), et les anticorps anti-RANK ligand) qui réduisent l'activité du remodelage osseux et sont aussi appelés agents anticataboliques. Les biphosphonates constituent la classe thérapeutique de référence. Leur action contre l'ostéoporose réside dans l'inhibition de la résorption osseuse. Ils inhibent le remodelage osseux car inducteurs de l'apoptose des ostéoclastes, sans diminuer l'activité des ostéoblastes (Thomas, 2006) et augmentent ainsi la minéralisation osseuse sans altération de la cristallinité. Deux molécules l'alendronate et le risédronate, ont fait l'objet d'études sur leur efficacité. Leur action a été analysée en terme d'augmentation de la densité minérale osseuse (au niveau de la hanche et du rachis lombaire) et d'effet antifracturaire par baisse de l'incidence de fractures vertébrales ou périphériques. Elles constituent les molécules de référence actuelles car augmentent toutes la densitométrie osseuse, et réduisent le risque de fractures, avec une bonne tolérance mais une durée de traitement restant encore à définir. Leur effet antifracturaire n'est pas supérieur



lors des associations avec les SERMs ou avec le THM (Thomas, 2006). Ils réduisent l'hyperactivité ostéoclastique post-ménopausique, car ce sont des modulateurs de l'activation des récepteurs des estrogènes. Les récepteurs aux oestrogènes alpha et bêta ont une expression cellulaire de niveau variable et un polymorphisme expliquant l'existence de mauvais répondeurs aux SERMs. Leur mécanisme d'action est à l'origine d'une baisse du risque fracturaire trabéculaire car ils diminuent la détérioration surtout dans le territoire du tissu spongieux (Alexandre, 2006). Mais ce mécanisme est aussi à l'origine d'une augmentation de survie des femmes avec un cancer du sein présentant des récepteurs estrogéniques. De là, découlent leurs indications : prévention ou traitement curatif chez les femmes ménopausées au risque fracturaire vertébral élevé et risque périphérique faible, d'autant plus que ces molécules ont un intérêt carcinologique et économique (Alexandre, 2006).

(v) Les agents anaboliques (ranélate de strontium et tériparatide) stimulent sélectivement les ostéoclastes. Le ranélate de strontium est un sel dont le principe actif est le strontium. Ce métal alcalinoterreux s'est révélé avoir des propriétés anaboliques osseuses sur des observations anatomopathologiques chez le rat au siècle dernier. Après fixation sur le cristal osseux sans altérer la minéralisation osseuse, il agit sur l'ostéoformation et sur la résorption ostéoclastique. Il multiplie les précurseurs et augmente la synthèse, des ostéoblastes. Il réduit la différenciation et l'activité des ostéoclastes, dont l'apoptose est aussi accélérée. Le tériparatide ou fragment de la parathormone humaine recombinante, est un stimulateur de la formation osseuse mais possède aussi un effet d'amélioration de la microarchitecture osseuse. C'est son administration intermittente qui est à l'origine d'un recrutement accru des préostéoblastes et d'une diminution de l'apoptose des ostéoblastes, par des mécanismes pas encore élucidés. Il entraîne une augmentation de la résistance osseuse chez l'animal notamment chez le singe, lors des tests biomécaniques, avec une augmentation de l'épaisseur corticale du col fémoral. A son arrêt un relais par biphosphonates semble favorable pour éviter une baisse de l'ostéodensitométrie (Cortet, 2006).

Par contre afin de freiner l'**arthrose**, il n'existe actuellement aucun moyen médicamenteux. Les antalgiques simples (de palier 1 ou 2) peuvent être utilisés lorsque la douleur est importante. Ces antalgiques peuvent être associés aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par cures courtes en recherchant la dose minimum efficace. En effet, ils comportent un risque de complications notamment intestinales (ulcères, hémorragies...) ; enfin les AINS ne sont efficaces que contre la composante inflammatoire de l'arthrose, mais

pas directement sur le mécanisme du vieillissement cartilagineux. Les infiltrations de cortisone, quant à elles sont proposées dans les périodes très aiguës et douloureuses de la maladie arthrosique. Elles ont un effet sur la composante inflammatoire, sur l'épanchement articulaire et sur la douleur. On peut aussi proposer des injections intra-articulaires d'acide hyaluronique dans l'articulation ; ce sont des produits qui nourrissent le cartilage articulaire partant du principe que l'on sait depuis plus d'un siècle que la viscosité du liquide articulaire est due à la présence d'un polysaccharide : l'acide hyaluronique. En 1934, Meyer et Palmer l'isolent, définissent chimiquement sa structure primaire. En 1966, les premières injections intra-articulaires d'acide hyaluronique sont faites chez des chevaux de course atteints d'arthropathies post-traumatiques et leur permettent de reprendre un entraînement normal. Rydell en 1972, Peyron et Balasz en 1974, puis Weiss en 1981 injectent une fraction d'un sel sodique d'acide hyaluronique dans des genoux arthrosiques humains avec de bons résultats sur la symptomatologie (Maheu, 2000). Le traitement actuel comporte de 2 à 5 injections. Ces injections ne sont pas ou très peu douloureuses. Le résultat de ce traitement est variable d'une personne à l'autre, mais il mérite toujours d'être essayé au début de la maladie arthrosique. La plupart des essais cliniques conduits avec l'acide hyaluronique ont montré une supériorité sur le placebo dans la gonarthrose, quel que soit le produit utilisé. L'action est symptomatique, se marquant par une diminution de la douleur (jugée sur une échelle visuelle analogique) et de la gêne. La consommation d'antalgiques ou d'AINS, quand elle a été évaluée, a été diminuée chez les patients traités. Enfin, il existe une dernière classe thérapeutique : les anti-arthrosiques d'action lente, qui comprend 4 molécules : la glucosamine sulfate, la chondroïtine sulfate, les insaponifiables d'avocat soja et la diacérhéine. On note quelques cas d'intolérance hépatique pour les insaponifiables d'avocat soja chez des patients insuffisants hépatiques, des rares cas d'allergie cutanée avec la chondroïtine sulfate, des épisodes colitiques voire diarrhéiques avec la diacérhéine ainsi qu'une coloration rouge des urines. Pour la glucosamine, aucun effet secondaire n'est référencé. Ils ont un effet variable d'une personne à l'autre; ils sont utilisés en traitement de fond. Seule la glycosamine aurait un effet symptomatique (Herrero-Beaumont *et al*, 2007) et structural (Mac Alindo *et al*, 2000).

## ***IV.2 Les comblements chirurgicaux***

Les comblements chirurgicaux d'une perte de substance osseuse ou cartilagineuse ont évolué sur ces dernières décennies notamment avec le développement de l'ingénierie tissulaire. Plusieurs stratégies thérapeutiques se sont développées, les premières se basant sur la stimulation des processus de réparation naturelle par recrutement de cellules progénitrices, d'autres sur le remplacement du défaut par un biomatériau.

Dans le cadre de la comminution ostéoporotique, en premier lieu furent utilisées, les greffes osseuses qui posent divers problèmes : morbidité imposée par le geste complémentaire de prélèvement de crête iliaque chez des sujets âgés fragiles et utilisation d'un greffon osseux lui aussi atteint de la même maladie : l'ostéoporose (Arrington *et al*, 1996) (Goulet *et al*, 1997).

Avec le temps, les substituts osseux furent de plus en plus utilisés dans le traitement des fractures porotiques. Contantz fit la première étude biomécanique évaluant un substitut osseux sur un radius cadavérique. Charnley fut le premier à les utiliser au niveau du radius distal, où il utilisa du ciment acrylique. Aux ciments acryliques ou PMMA (polyméthyl-méthacrylate) furent reprochés le manque d'intégration osseuse essentiellement et leur exothermie. En 1985, Brown et Chow mettent au point des ciments minéraux ou ioniques de structure voisine proche de l'os. Enfin ce fut l'avènement du ciment phospho-calcique. Jupiter réalisa les premières études biomécaniques qui ont permis d'évaluer les propriétés du Norian® en complément d'ostéosynthèse sur des radius cadavériques démontrant son intérêt (Jupiter *et al*, 1997). Puis Kopylov (Kopylov *et al*, 2006) publia les premiers cas cliniques d'utilisation des ciments phospho-calciques avec le Norian® dans ces fractures et obtint de bons résultats. D'autres auteurs tels que Sanchez-Sotelo (Sanchez-Sotelo *et al*, 2000), Jeyam (Jeyam *et al*, 2002), Cassidy, Tyllianakis et Obert (Obert *et al*, 2004) firent tous des études utilisant le Norian® seul avec plâtre ou associé à une ostéosynthèse par broche, plaque vissée ou fixateur externe. Tous eurent de bons résultats avec une récupération fonctionnelle rapide et une meilleure évolution clinique et radiologique. Selon la SOFROT (Société Française de Recherche Othopédique et Traumatologique), à l'initiative du GESTO (Groupe pour l'Etude des Substituts Tissulaires et Osseux en Orthopédie) peut être considéré comme un substitut osseux : « Tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique, destiné à l'implantation chez l'homme dans la perspective d'une reconstruction du stock osseux, par

renforcement d'une structure osseuse ou le comblement d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique » (Mainard *et al*, 2011).

Le substitut osseux est un biomatériau, qui permet de combler la perte de substance osseuse, et dont les buts sont d'augmenter la résistance osseuse d'un os porotique et d'améliorer ses propriétés mécaniques. Il a la capacité de combler les vides métaphysaires et devrait permettre d'empêcher le tassement secondaire d'une zone d'impact de l'os spongieux et maintenir la hauteur comblée au dernier recul. En fait, il ne peut pas être utilisé seul sans moyen d'ostéosynthèse et il peut uniquement substituer une greffe osseuse.

Parmi les différents ciments phospho-calciques on distingue :

- les ciments « brushitiques » dont le matériau final est la brushite ou phosphate de calcium acide :  $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,
- les ciments à base de phosphate octocalcique, qui évoluent vers une apatite et durcissent lors de la mise en place sur le site par élévation de la température,
- les ciments, dont la phase finale aboutit à une apatite, préparés par une réaction initiale acido-basique.

Le ciment phospho- calcique est aussi appelé ciment apatitique, ionique ou hydraulique, il est totalement synthétique. Le ciment est constitué par une phase solide et une phase liquide. La phase solide est représentée par le mélange de phosphate de calcium tricalcique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , de phosphate tétracalcique  $\text{Ca}_4(\text{P}_2\text{O}_7)$  et de glycéronate de sodium. La phase liquide est acide contenant des ions phosphate et des ions calcium. Après gâchage, des phases solides et liquides, une réaction d'hydrolyse ou une réaction de type acide-base a lieu et conduit à la formation d'un sel phosphocalcique qui précipite après succession de différentes phases :

- (i) une première phase de cristallisation ou brushitique, où le ciment prend et perd sa maniabilité,
- (ii) une seconde phase intermédiaire ou octocalcique,
- (iii) une phase phase finale ou apatitique avec la formation de l'hydroxyapatite stable. Sa composition est celle observée en milieu vivant lors de la formation de cristallites d'os. C'est donc le substitut le plus proche de l'os naturel en ce qui concerne le rapport calcium/phosphore d'après Mejdoubi (Mejdoubi *et al*, 1994).

Le ciment phospho-calcique ne présente aucun effet cytotoxique, ni mutagène ou sensibilisant. Il ne provoque aucune réaction inflammatoire et se dégrade sans libération de molécules toxiques. Il acquiert de façons optimales ses propriétés physiques au bout de 72 heures. Il présente une excellente biocompatibilité car sa composition est proche des structures de l'os minéral et par sa faible exothermie nécessaire au durcissement. Il est bioactif non inerte, biorésorbable, et présente une excellente biointégration. Il est ostéoconducteur, recolonisé progressivement par les ostéoblastes. Pour Liverneaux (Liverneaux, 2004), il est également microporeux, d'où la lenteur de sa biodégradation en fonction du volume implanté. Mais il n'est pas macroporeux ce qui lui procure une contrainte à la rupture en compression de 20MPa supérieure à celle de l'os trabéculaire physiologique 1 à 7 MPa. D'un point de vue résistance, le ciment entraîne de façon expérimentale (Liverneaux, 2004), une augmentation de la densité totale osseuse de 1,61, de la densité de l'os trabéculaire de 2,85, des indices de résistance osseuse de 1,99 et du SSI (Stress Stain Index) index de résistance mécanique. La résistance osseuse s'en trouve alors doublée et le ciment a une résistance mécanique meilleure à la compression que l'os trabéculaire.

Dans le cadre d'une perte de substance osseuse post-traumatique, on peut utiliser le principe de la membrane induite. Le principe de cette technique repose sur la formation d'une membrane vascularisée induite par l'implantation dans un premier temps dans un défaut osseux d'un espaceur en ciment PMMA. Dans un second temps, le ciment PMMA est ôté tout en prenant soin de conserver la membrane induite autour et une auto-greffe osseuse est réalisée 2 à 3 mois plus tard avec dépôt de la moelle osseuse. L'espaceur a permis l'induction d'une membrane de type pseudo-synoviale très vascularisée qui va jouer dans le second temps un rôle de protection de l'auto-greffe spongieuse (Masquelet *et al*, 2010). Cette technique exigeante permet aux chirurgiens orthopédistes des reconstructions de perte de substance osseuse pouvant atteindre 25 cm. La membrane semble protéger le greffon spongieux de la résorption en améliorant sa vascularisation, son remodelage et son adaptation aux contraintes mécaniques. Cette membrane contiendrait des facteurs de croissance ostéomodulateurs et angiogéniques (VEGF, TGF- $\beta$ , BMP-2) qui sont connus pour recruter les cellules ostéoformatrices et qui stimulent leur croissance.

Dans le cadre d'une destruction massive d'une articulation ou d'une arthrose très évoluée, le remplacement prothétique s'impose. Que l'arthroplastie soit totale ou partielle, l'évolution des pratiques cliniques s'est faite ces dernières années vers des techniques de mise en place, dites « mini-invasives » ou assistées par ordinateur « navigation » (Facca *et al*,

2010). Par contre dans le cas de lésions très localisées comme dans le cas d'une ostéochondrite, il existe des alternatives curatives comme les autogreffes ostéochondrales en mosaïque (Versier *et al*, 2000), les greffes de chondrocytes autologues ou les greffes périostées (Lorentzon *et al*, 1998).

Le domaine de la réparation de lésions ostéo-articulaires focales est un domaine en expansion et qui a marqué les pratiques chirurgicales ces 10 dernières années. En commençant par la stimulation des processus naturels de réparation du cartilage et le recrutement de cellules progénitrices contenues dans la moelle avec la technique des microfractures (Keeney *et al*, 2011). Saw publiait en 2009, une étude expérimentale animale sur la régénération cartilagineuse après injection de cellules autologues de moelle osseuse et d'acide hyaluronique dans l'articulation fémoro-tibiale (Saw, 2009). Il a démontré que l'injection de cellules issues de la moelle osseuse associée à l'acide hyaluronique, en intra-articulaire dans le compartiment fémoro-tibial, favorisait la régénération ostéo-articulaire après forage des surfaces ostéochondrales. En 2011, il publie ses résultats chez l'Homme (Saw, 2011) et conclue à une très bonne régénération du cartilage chez les patients ayant eu une injection associée de cellules souches et d'acide hyaluronique en intra-articulaire au niveau du genou suite à des contrôles arthroscopiques et à l'analyse histologique des biopsies.

Enfin, des techniques de thérapie cellulaire, ont pour ambition la régénération complète de la lésion focale du cartilage hyalin, comme la greffe de chondrocytes. Cette technique consiste à prélever des chondrocytes autologues périphériques en périphérie de l'articulation puis à les amplifier *in vitro*. Le concentré cellulaire de chondrocytes est implanté au sein du défaut cartilagineux après l'avoir recouvert d'un lambeau périosté prélevé à la face antéro-médiale du tibia. L'intérêt de cette technique reste controversé (Keeney *et al*, 2011).

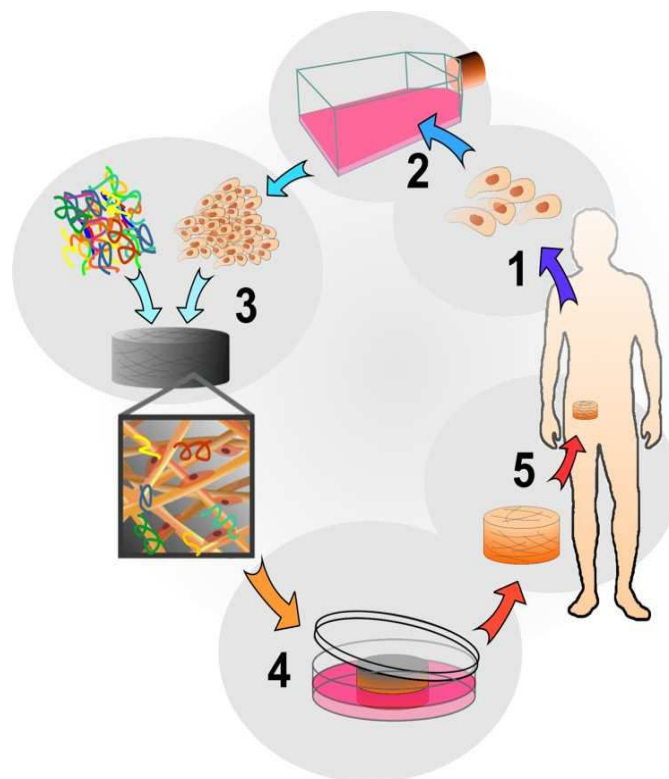
*Une des perspectives dans la prise en charge des pertes de substance, est le développement de l'ingénierie tissulaire couplé aux connaissances : en biomécanique et en ingénierie des polymères. Une des méthodes séduisante dans l'avenir est de fabriquer un biomatériau « support » qui aurait l'architecture 3D souhaitée adaptée à la perte de substance osseuse ou ostéo-articulaire et d'y ajouter soit des cellules, soit des facteurs de croissance, afin de régénérer le tissu altéré.*

## V - Biomatériaux et ingénierie tissulaire

Face aux besoins croissants de comblement ou remplacement, nous sommes rentrés dans l'aire de la médecine régénérative. Le développement de biomatériaux « intelligents » est en vogue. Grâce à l'adjonction d'une composante vivante (cellules) en leur sein, pour les rendre « vivants » et de substances pharmacologiques (facteurs de croissance) par des processus de fonctionnalisation pour les rendre « bioactifs », ils sont capables de reproduire fidèlement l'architecture souhaitée du tissu à régénérer. L'apport récent de la nanotechnologie en pleine expansion, permet en outre de nanofonctionnaliser ces nouveaux biomatériaux.

### V.1 Les cellules

La thérapie tissulaire ou cellulaire est basée, soit sur des cellules autologues, soit sur des cellules souches. Les cellules peuvent être utilisées seules ou avec des biomatériaux. Les cellules primaires ou souches vont alors permettre de rendre un biomatériau actif. Le principe général consiste à prélever des cellules du patient, à les mettre en culture, à les mixer au support (biomatériau implantable), à les faire se multiplier à l'intérieur de ce support, puis à planter sur le patient le biomatériau devenu actif (Figure 15).



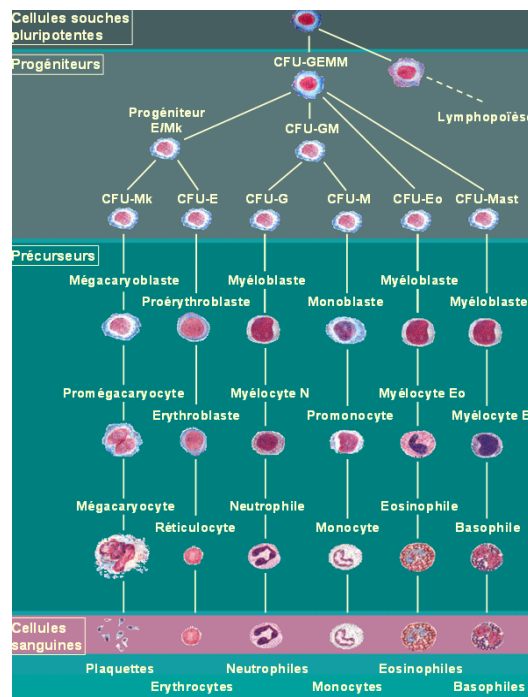
**Figure 15 : Principe de l'ingénierie tissulaire à partir de cellules autologues**  
(George, 2009)

a) **les cellules souches mésenchymateuses (CSM)** sont **des cellules multipotentes ou pluripotentes** capables de se différencier vers des lignées chondrocytaires, ostéocytaires, stromacytaires et adipocytaires (Dani, 2006). *In vitro*, ces CSM sont caractérisées par leur capacité à générer des clones des « Unités Formant des Colonies de type fibroblastiques » ou CFU-f (Trojani *et al*, 2008) et elles adhèrent au support de culture. Séparées par lavage, ces clones stoppent leur prolifération par inhibition de contact. Selon le milieu de culture, elles présentent des voies de différenciation différentes (orientation vers la voie ostéoblaste par exemple) (Trojani *et al*, 2008). Cette plasticité des CSM est expliquée par 3 théories :

- (i) la différenciation (ou passage d'un état cellulaire à un autre),
- (ii) la persistance de CSM embryonnaires permettant à l'âge adulte la régénération tissulaire,
- (iii) la fusion cellulaire.

En ce qui concerne leur source, les CSM sont présentes dans plusieurs tissus de l'organisme :

(i) **la moelle osseuse** : qui est la source la plus importante, la plus riche et la plus accessible. La moelle osseuse contient différents types de cellules souches : les CSM qui assurent la fonction de soutien stromal, les cellules souches hématopoïétiques qui donnent les lignées sanguines (Figure 16) et les MAPC ou « multipotent adult progenitor cells » cellules pluripotentes équivalents de CSE qui seraient les ancêtres des populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse.



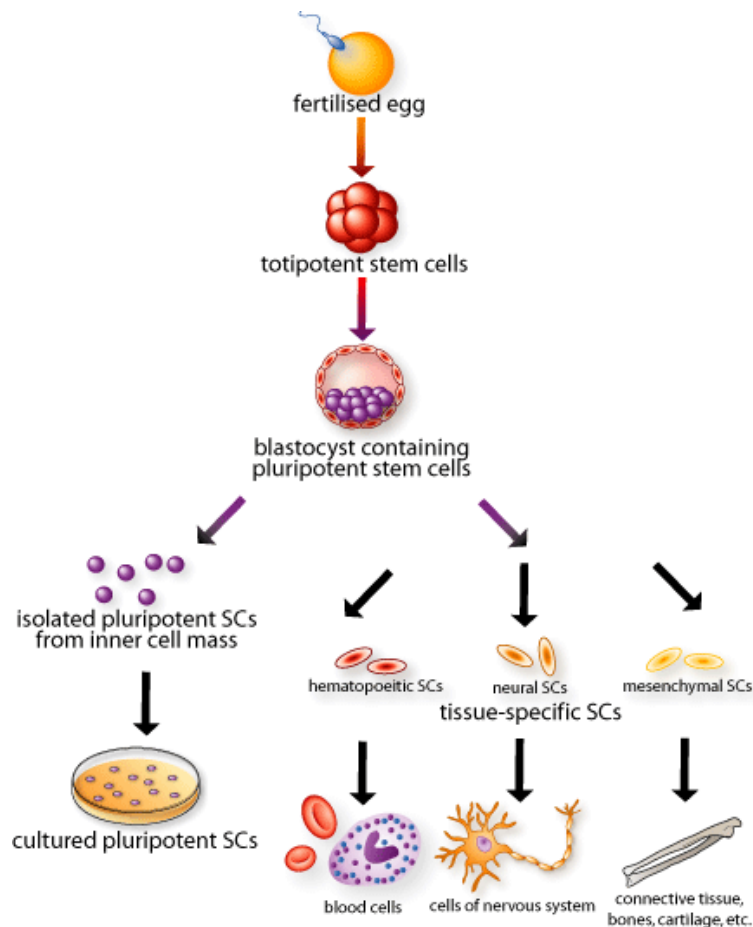
**Figure 16 : Les cellules souches mésenchymateuse de la lignée hématopoïétique**



(ii) **les tissus conjonctifs** de l'adulte contenant aussi un faible pourcentage des CSM, comme le tissu adipeux, le périoste, le liquide synovial, les muscles ou les tendons.

**b) Les cellules souches embryonnaires (ES)** sont des **cellules totipotentes**, issues des premières divisions embryonnaires au stade de blastula, elles dérivent donc de la masse cellulaire interne des blastocystes (Doetschmann *et al*, 1985) (Figure 17). Elles sont maintenues à l'état indifférencié par culture sur une couche de cellules nourricières ou avec certains facteurs de croissance. Elles peuvent donner plusieurs lignées cellulaires différentes (Resnick *et al*, 2012), comme des cardiomyocytes et être utilisées pour des greffes cardiaques (Loubet *et al*, 1998).

Pour que les ES se différencient, il est nécessaire qu'elles puissent former des structures tridimensionnelles appelées corps embryoïdes ou « embryoïd bobies » (EB) (Loubet *et al*, 1998). Ceux-ci ne se forment que si les cellules sont placées dans des conditions où elles ne peuvent pas s'attacher au plastique de la boîte de Pétri. Pour se faire, la culture des ES a lieu dans un système de « gouttes pendantes » (Loubet *et al*, 1998).



**Figure 17 : Les cellules souches issues de l'oeuf fécondé au stade blastula**

Cette méthode fait intervenir les forces de gravitation et permet de contrôler le nombre de cellules qui participent à la formation des agrégats. La préparation des ES humaines implique la production d'embryon humain puis le prélèvement des cellules du bouton embryonnaire au stade de blastocyte nécessitant la destruction de l'embryon. De plus au cours de la culture peuvent apparaître des mutations génétiques avec des risques de tumeurs secondaires. Leur utilisation *in vivo* se heurte donc à des problèmes éthiques. Par contre, elles représentent un bon modèle *in vitro* pour étudier la succession de l'expression des protéines osseuses durant l'ostéogénèse embryonnaire (Buttery *et al*, 2001) (Philipps *et al*, 2001) (Zur Nieden *et al*, 2003), les processus moléculaires de développement de la lignée ostéoblastiques, les phénomènes de minéralisation de la MEC et évaluer l'effet par exemple l'influence de la vitamine C ou D (Zur Nieden *et al*, 2003), ou l'effet de facteurs de croissance spécifiques du tissu osseux. A l'adjonction de  $\beta$ -glycérophosphate et acide ascorbique au 5<sup>e</sup> jour de culture elles se différencient en lignée ostéoblastique (Zur Nieden *et al*, 2003).

**c) Les ostéoblastes primaires humains**, sont issus de biopsie osseuse (ou de déchets opératoires). Des petits fragments d'os trabéculaires sont découpés, rincés dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) pour éliminer les cellules sanguines. Ces fragments sont ensuite mis en culture dans un incubateur à 37°C. Les cellules primaires sont ainsi récoltées quelques jours plus tard. Les ostéoblastes primaires humains représentent le meilleur modèle pour étudier la réponse ostéoblastique. Malheureusement leur utilisation pose plusieurs problèmes. Souvent en raison de l'absence de pureté de la population cellulaire, on doit contrôler le phénotype en cours de culture et ces cellules doivent être utilisées dans les passages précoces car on peut observer une dédifférenciation des cellules ostéoblastiques après plusieurs passages.

**d) Les chondrocytes primaires** sont extraits soit d'animaux euthanasiés, soit de tissus humains type déchets opératoires. Ils sont ensuite cultivés en monocouche avant d'être amplifiés. Mais l'amplification de ces cellules à un faible rendement (Chung *et al*, 2008) et induit une différenciation en cellules fibroblastes-like qui produisent du collagène de type I (Brodkin *et al*, 2004). Mais il a été démontré qu'un environnement 3D permettrait de les redifférencier en chondrocytes (Wang *et al*, 2008).

## V.2 Les biomatériaux

*L'utilisation de cellules seules pour la régénération d'un tissu présente des limites. En fonction de la pathologie ciblée, l'ingénierie tissulaire et cellulaire est insuffisante pour le comblement d'une lésion osseuse ou ostéo-articulaire. L'apport d'un biomatériau s'avère nécessaire car il va mimer l'environnement 3D des cellules.*

### V.2.1 Définition & cahier des charges

La Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux, dite conférence consensus, en 1986 a retenu la définition suivante pour les biomatériaux : « **Matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques** ».

Les biomatériaux, une fois implantés posent le problème de leur sécurité, de leur devenir dans l'organisme, de leur biotolérance et de leur biofonctionnalité. Répondent-ils au cahier des charges ? En effet, un biomatériau implantable doit être non toxique, non cancérogène, biocompatible. La biocompatibilité consiste à la capacité pour le matériau d'être accepté par un être vivant. Différentes normes décrivent les tests biologiques auxquels un matériau doit satisfaire, pour être biocompatible. La biotolérance est le degré minimal de la biocompatibilité. Un matériau considéré comme biotoléré, peut donc avoir quelques effets nocifs, comme une capsule fibreuse autour. Dans le cadre de l'ingénierie osseuse, il doit avoir la capacité de s'intégrer à l'os et être ostéoconducteur. Si le matériau peut engendrer la formation d'un tissu osseux au contact de l'os, il est considéré comme ostéoconducteur, quand il stimule les ponts cellulaires, la synthèse de la matrice extracellulaire, la migration cellulaire, la multiplication et différenciation cellulaire, sans altérer ni le génotype ni le phénotype cellulaire. Si possible pour l'ingénierie tissulaire osseuse, il est au mieux **ostéoinducteur, biorésorbable, bioactif, et poreux**. Un matériau est ostéoinducteur, s'il peut entraîner une formation de tissu osseux sur un site extra-osseux. Un matériau destiné à se résorber et à être remplacé par un tissu vivant est qualifié de biorésorbable. Bioactif signifie que le matériau accélère les processus de réparations tissulaires, il interagit avec l'organisme et le contact entre le tissu et le matériau est direct. Il peut renfermer des principes actifs comme des médicaments ou des facteurs de croissance (Benkirane *et al*, 2004). La microporosité d'un matériel est l'état d'une surface constituée de pores de très petite taille (1 à 5  $\mu\text{m}$ ). Cette microporosité permet une colonisation rapide du matériel par les ostéoblastes.

L'ostéointégration et l'ostéocoalescence définissent une interface mécaniquement fonctionnelle entre le tissu osseux et le biomatériau. Lorsqu'il s'agit d'un biomatériau inerte, on parle d'ostéointégration, il n'y a pas au niveau de cette interface d'interaction biologique entre l'os et le matériau. Par contre, lorsqu'il s'agit d'un biomatériau actif, les interactions chimiques entre le matériau et l'os aboutissent à une interface fonctionnelle et caractérisent l'ostéocoalescence (SOFROT, 2011).

Il existe 2 types de biomatériaux, non dégradables et dégradables. Nous détaillerons un biomatériau non dégradable, que nous avons utilisé pour le fonctionnaliser et des biomatériaux dégradables que nous avons synthétisés puis fonctionnalisés.

## V.2.2 Biomatériaux non dégradables

En chirurgie orthopédique, les implants utilisés (prothèses ou matériels d'ostéosynthèse) sont généralement des matériaux inertes non dégradables. On utilise couramment des alliages en acier inoxydable (à base de chrome, cobalt, nickel, molybdène) avec des avantages de coût mais des problèmes de métallose. Les recherches se sont donc orientées vers l'utilisation d'autres matériaux, comme le pyrocarbone qui a un coefficient d'élasticité proche de celui de l'os et qui présente la particularité de ne pas s'ostéointégrer. Le titane et ses alliages présentent des caractéristiques intéressantes, raisons pour lesquelles nous nous sommes intéressés au titane comme biomatériau de choix pour cette étude.

**a) L'historique :** le titane a été découvert en 1789, par le révérend William Gregor un minéralogiste britannique. En analysant des sables de la rivière Helford en Cornouailles, il isola ce qu'il nomma du sable noir, connu aujourd'hui sous le nom d'ilménite. Suite à plusieurs manipulations physico-chimiques (extraction du fer par des procédés magnétiques et traitement du résidu par de l'acide chlorhydrique), il produisit un oxyde impur qu'il nomma menachanite. Indépendamment de cette découverte, en 1795 Martin Heinrich Klaproth, professeur de chimie à l'université de Berlin, identifia le même métal. Alors qu'il analysait les propriétés du rutile, il conclut que le minerai contenait un métal inconnu identique à celui de Gregor. Il lui donna son nom actuel de « titane », tiré de la mythologie grecque, en ignorant totalement ses propriétés physico-chimiques. Il a fallu attendre plus d'un siècle après la découverte de Gregor pour que l'américain Matthew Albert Hunter soit capable en 1910 de produire du titane pur à 99 %. C'est seulement en 1939, que le procédé industriel de production du titane est finalement mis au point par Wilhelm Justin Kroll, métallurgiste et

chimiste luxembourgeois, par réduction du  $\text{TiCl}_4$  avec du magnésium.

**b) Les propriétés intéressantes du titane** du point de vue biomédical sont :

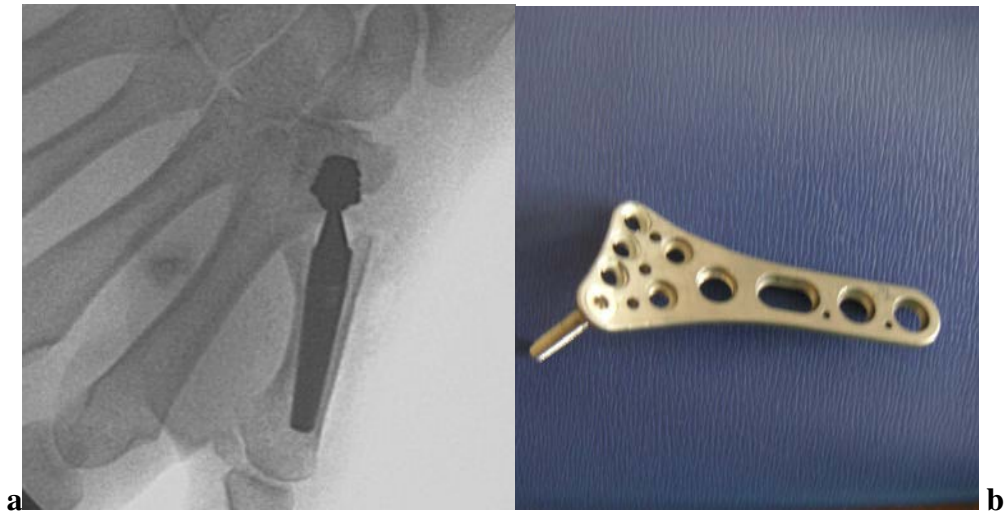
(i) ces propriétés physiques : sa résistance à la corrosion (Scharvogel *et al*, 2011) et à l'érosion (Sarma *et al*, 2011), dans de nombreux milieux tels que l'eau de mer ou l'organisme humain, sa résistance au feu (ses caractéristiques mécaniques restent élevées jusqu'à une température d'environ 600 °C), sa porosité, sa faible densité (Scharvogel *et al*, 2011) et sa radio-opacité.

(ii) ces propriétés mécaniques : ses caractéristiques de résistance à l'usure (Sarma *et al*, 2011), ductilité, fatigue..., permettent notamment de façonner des pièces de titane fines et légères, son module de Young ou module d'élasticité (E) très bas, qui se situe entre 100 GPa et 110 GPa (faible comparé à celui de l'acier inox aux alentours de 220 GPa) et qui en fait un matériau particulièrement intéressant pour sa biocompatibilité avec le tissu osseux. Cette élasticité favorise le remodelage osseux en l'obligeant l'os à travailler (prévention du *stress shielding*). Le titane est **mécanocompatible**.

(iii) ces propriétés chimiques : le Centre International de Recherche sur le Cancer a classé le dioxyde de titane dans le groupe 2B « susceptible d'être cancérigène pour l'humain » : les études menées ne permettent pas de conclure ; le titane est un métal extrêmement oxydable. L'une des causes de la résistance à la corrosion du titane est le développement d'une couche protectrice passivante très adhérente de quelques fractions de micromètre, constituée majoritairement de  $\text{TiO}_2$ .

(iv) son utilisation biomédicale : depuis une trentaine d'années, le titane est utilisé en chirurgie orthopédique, l'os adhérant spontanément au titane, ce qui en fait un matériau privilégié pour la réalisation de prothèses articulaires (Figure 18a) mais aussi en chirurgie traumatologique et en chirurgie maxillo-faciale pour la réalisation de vis et de plaques d'ostéosynthèse (Figure 18b) (Mears, 1977). De nos jours, le titane est couramment employé dans le *design* de nombreux implants sous forme pure ou d'alliage à cause de sa résistance, sa légèreté et sa relative inertie (Campbell, 2003). De plus il faut signaler l'apparition d'outillage en titane pour la chirurgie, comme les forets creux refroidis à l'eau. A l'inverse de l'acier, tout débris d'outil en titane pouvant rester dans le corps n'occasionnera pas de réaction, du fait de sa biocompatibilité. Le prix du titane reste tout de même un facteur limitatif à son utilisation (Scharvogel *et al*, 2011). Le titane est aussi utilisé en chirurgie

dentaire (Vandamme *et al*, 2011), où il sert d'implant dans l'os pour les supports de prothèses ainsi que pour la confection d'infrastructures prothétiques appelées « armatures ». Le Nickel-Titane est aussi utilisé en orthodontie où ses propriétés super-élastiques en font un matériau de choix pour la fabrication des arcs qui permettent de corriger la position des dents.



**Figure 18 : Biomateriaux en titane pour la chirurgie de la main**  
*Prothèse trapézométacarpienne en titane (a) & plaque et vis d'ostéosynthèse pour radius distal en titane (b)*

### V.2.3 Biomateriaux dégradables

Les polyélectrolytes sont des macromolécules possédant des sites ioniques et/ou ionisables. Dans un solvant, le polymère se dissocie permettant l'obtention de charges sur les chaînes de polymère et l'apparition en solution de contre-ions de charge opposée. Les chaînes de polymères chargées positivement sont nommées polycations, celles chargées négativement sont des polyanions. La densité de charge des chaînes de polyions et la force ionique de la solution, qui dépend de l'ensemble des ions en solution (polyion, contre-ion et sel ajouté), sont des paramètres primordiaux qui influencent la conformation des chaînes de polyélectrolytes et par voie de conséquence les propriétés du film telles que son épaisseur et sa rigidité. Les charges de même signe portées par une chaîne ont tendance à se repousser, ainsi, la longueur de persistance augmente et la conformation de la chaîne est de type « bâtonnet ». L'ajout d'un sel dans la solution qui entraîne une augmentation de la force ionique engendre un changement de conformation de la chaîne. Les ions provenant de la dissociation du sel permettent l'écrantage des charges du polyion et diminuent ainsi leur

répulsion. La chaîne prend alors une conformation plus globulaire, de type « pelote statistique ». L'ajout de sel dans la solution peut ainsi permettre d'augmenter l'épaisseur du film (Ladam *et al*, 2000).

La force ionique est un paramètre important intervenant dans l'épaisseur des films, que ce soit pour les polyélectrolytes faibles ou les polyélectrolytes forts. Les polyélectrolytes forts possèdent un degré d'ionisation peu sensible aux variations de pH, contrairement aux polyélectrolytes faibles. Le pH, quant à lui, influence l'épaisseur d'une bicouche dans le cas des polyélectrolytes faibles. Une faible densité de charge conduit à des films épais ; il existe tout de même une valeur seuil de degré d'ionisation en dessous duquel le film ne se construit pas. La croissance des films multicouches a été largement étudiée et a permis de différencier deux modes de croissance :

(i) le mode de croissance linéaire qui concerne les films dont l'épaisseur croît linéairement avec le nombre de couches déposées. Il peut être obtenu à partir de polyélectrolytes forts et faibles (Decher, 1997).

(ii) le mode de croissance exponentielle correspond aux films dont la croissance varie exponentiellement avec le nombre de couches déposées. Ce mode de croissance a été mis en évidence à la fin des années 1990 lorsqu'on commença à étudier les multicouches à base de polypeptides et/ou polysaccharides. L'épaisseur varie de quelques centaines de nanomètres à quelques dizaines de micromètres (Richert *et al*, 2004).

En fonction de l'application et de la cible thérapeutique, les polyélectrolytes peuvent être d'origine synthétique ou naturelle :

**a) Parmi les polyélectrolytes synthétiques**, les plus utilisés dans la construction de films multicouches sont le poly(éthylèneimine) (PEI), le poly(styrène sulfonate) (PSS), le chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMAc), l'acide poly(acrylique) (PAA) et le poly(chlorure d'allylamine) (PAH).

Ces polyélectrolytes sont largement étudiés pour la compréhension des caractéristiques physico-chimiques de la construction de ces films et leur stabilité.

Les propriétés biologiques des films construits à partir de polyélectrolytes synthétiques peuvent être apportées par l'incorporation de molécules actives. Ainsi des capsules multicouches de PAH/PAA ont été utilisées pour la libération d'un anti-inflammatoire nommé Kétoprofène (Berg *et al*, 2005).

Les polyélectrolytes synthétiques peuvent aussi se lier directement aux molécules biologiques par interactions électrostatiques et former des films multicouches polymères synthétiques/molécules biologiques. Dans ce cas les molécules actives possèdent un double rôle, elles rentrent dans la construction du film et apportent les propriétés biologiques. Ainsi, le sulfate de protamine (PrS) étant un polypeptide ostéoconducteur, des films (PSS/PrS) ont été construits pour améliorer la prolifération, la différenciation des cellules et la minéralisation de la MEC, (Samuel *et al*, 2011). Ils peuvent aussi servir à la construction de films multiprotéines tels que les films (PSS/Lys)<sub>2</sub>-(PSS/PEI)-(GOD/PEI) (GOD : glucose oxydase). Ces polyélectrolytes synthétiques sont généralement utilisés en très faibles quantités comme simples films précurseurs. Ces films précurseurs ne dépassent généralement pas trois bicouches et correspondent aux fondations pour la construction de films à partir de polymères naturels (Ai *et al*, 2003). Des films PEI/(PSS/PAH) (Chluba *et al*, 2001 ; Etienne *et al*, 2005 ; Vodouhê *et al*, 2005) et PDADMAc/PSS (Dubas *et al*, 2009) sont aussi envisagés comme films précurseurs pour leur grande stabilité.

**(b) Parmi les polyélectrolytes naturels,** les plus intéressants sont ceux pour la construction de films multicouches appliqués au domaine biomédical du fait de leur biocompatibilité et de leur biodégradation. De plus, ces polyélectrolytes n'étant pas bioinertes, ils peuvent apporter des propriétés biologiques intéressantes aux films. Pour une bioactivité plus spécifique, des molécules actives peuvent être ajoutées lors de la construction du film ou ultérieurement. Généralement, les films multicouches de polyélectrolytes naturels sont construits à partir de polysaccharides ou de polypeptides. La combinaison de polysaccharides et de polypeptides à l'intérieur d'un même film est aussi envisageable dans le but d'obtenir des propriétés biologiques différentes.

**Les polypeptides** les plus utilisés dans la construction des films multicouches sont l'acide poly (L-glutamique) (PIGA) et la poly (L-lysine) (PLL) :

La poly (L-lysine) est un polymère composé d'un enchaînement de L-lysine, un acide aminé constituant les protéines. Ce polymère étant biocompatible et biodégradable, il est largement utilisé en biologie (Rypacek, 1998 ; Ren *et al*, 2006). Il est notamment employé pour le transport de principe actif (Ryser *et al*, 1978) et pour le transfert de gènes (Anas, 2004). La charge de la PLL étant positive, elle peut se complexer avec l'ADN, ainsi, elle est envisagée comme vecteur non viral dans les thérapies géniques. Ce polypeptide est aussi connu pour améliorer l'attachement de nombreux types cellulaires grâce à des interactions



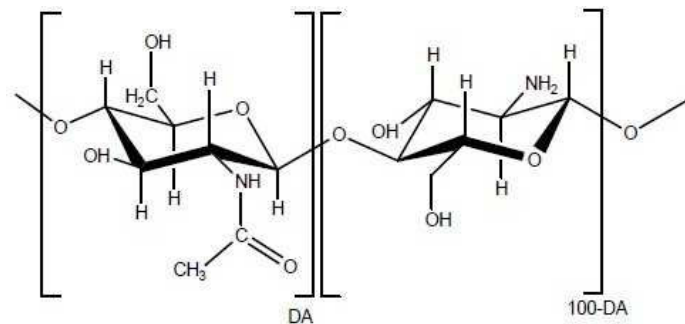
électrostatiques non spécifiques (Jacobson *et al*, 1977). En effet, la PLL permet de modifier la charge d'une surface, de la rendre positive, ainsi, elle peut interagir avec la membrane plasmique des cellules qui est chargée négativement. De plus, la structure chimique de la PLL permet le greffage covalent de molécules actives telles que l' $\alpha$ -mélancortine ( $\alpha$ -MSH) (Chluba *et al*, 2001; Jessel *et al*, 2003). Ainsi, l'utilisation de ce polyélectrolyte dans la construction de films multicouches pour des applications biomédicales semble prometteuse.

L'acide poly (L-glutamique) est un polymère composé de monomères d'acide L-glutamique, un des acides aminés constituant les protéines. De par sa composition, il est biocompatible et biodégradable. Il est souvent associé à la PLL pour la construction de films multicouches naturels. Des peptides tels que la chromofungine peuvent être insérés dans le film pour une protection locale antifongique (Etienne *et al*, 2005). Le PIGA peut être modifié chimiquement dans le but de greffer de manière covalente des molécules actives telles que des peptides d'adhésion ou des molécules anti-inflammatoires (Schultz *et al*, 2005). Ses propriétés d'adhésion ont été vérifiées pour différents types cellulaires (Tryoen-Tóth *et al*, 2002).

**Les polysaccharides** rentrant dans la composition des films multicouches regroupent l'héparine, le dextran, l'alginate, l'acide hyaluronique et le chitosane (CHI). De part leurs propriétés intéressantes, l'acide hyaluronique et le chitosane sont actuellement les plus étudiés pour créer des films bioactifs.

L'acide hyaluronique est un polysaccharide anionique composé d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine liés entre eux par des liaisons glycosidiques alternées  $\beta$ -(1-4) et  $\beta$ -(1-3). Il est le seul glycosaminoglycane (GAG) non sulfaté. C'est un constituant de l'humeur vitrée de l'œil, il est aussi très abondant dans la MEC et dans le liquide synovial (Picart *et al*, 2001). Il possède de nombreuses applications biologiques. Ses propriétés d'hydratation lui permettent de rentrer dans la composition de produits cosmétiques et des collyres Fermavisc® sine, il est ainsi utilisé comme agent de mouillage pour soigner les yeux secs. Grâce à ses propriétés de lubrification, ce composé possède des applications en chirurgie réparatrice. Ainsi, il est injecté par voie intra-articulaire pour soigner l'arthrose sous le nom d'Hyalgan®. Ses propriétés physico-chimiques et biologiques en font un bon composé pour la construction de films multicouches. Ainsi, des constructions PLL/HA ont été étudiées (Picart *et al*, 2001; Vodouhê *et al*, 2006). Des principes actifs tels que des agents antiprolifératifs (paclitaxel) peuvent être ajoutés après la construction de ces films (Vodouhê *et al*, 2006) ou greffés directement à l'acide hyaluronique (Thierry *et al*, 2005).

Le chitosane fait partie de la famille des chitineux. C'est le seul polycation naturel. Il est présent dans certains champignons et peut être obtenu à partir de la chitine par une désacétylation partielle en conditions alcalines (soude concentrée) ou par hydrolyse enzymatique en présence de chitine désacétylase (Rinaudo, 2006). C'est un polysaccharide linéaire formé par l'enchaînement d'unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées entre elles par des liaisons de type  $\beta$ -(1-4) (Figure 19). Le degré d'acétylation que l'on notera par la suite DA correspond au pourcentage molaire d'unités N-acétyl-glucosamine par rapport au nombre total d'unités. Dans la littérature, on appelle généralement chitosane, tout polymère chitineux dont le DA est inférieur à 60%, la chitine correspond alors au polymère dont le DA est supérieur à 60% (Illum, 1998).



**Figure 19 : Structure chimique du chitosane (DA : degré d'acétylation)**

Le chitosane est autorisé par la FDA (*Food Drug Administration*). C'est un polymère biocompatible, biodégradable non toxique et biologiquement actif (Rinaudo, 2006). Il a des applications dans les domaines diététiques et cosmétiques, entrant notamment dans la composition de certaines crèmes de soin, de shampoings et de produits amaigrissants. Il est aussi utilisé comme pesticide (Sol-Actif®) et pour la dépollution des eaux (Biofloc-Plus®). Actuellement les recherches se concentrent sur les applications biomédicales du chitosane. De part ses propriétés de biocompatibilité et de biorésorption, il peut être utilisé comme implant dégradable dans l'organisme sous forme d'hydrogels, de membranes fibreuses ou d'éponges (Rinaudo, 2006).

De plus, le chitosane présente des propriétés antibactériennes (Ravi Kumar, 2000), antimicrobiennes, antiongiques, antithrombotiques, antitumorales, antioxydantes et anti-coagulantes (Ravi Kumar, 2000). Selon son DA, le chitosane peut engendrer une bonne adhésion et prolifération de différents types cellulaires tels que les ostéoblastes (Seol *et al*, 2004), les kératinocytes (cellules de la peau) et les cellules neuronales. Il peut aussi être lié de manière covalente à des peptides d'adhésion tels que le RGD pour améliorer l'adhésion

cellulaire (Chua *et al*, 2008). Les propriétés biologiques du chitosane et sa composition chimique en font un très bon candidat pour la construction de films multicouches de polyélectrolytes. Ainsi, il est associé à différents polyanions naturels tels que la gélatine, l'alginate, le dextrane, ou l'héparine.

**Le collagène** est une protéine, le plus souvent présente sous forme fibrillaire. Il est présent dans la matrice extra-cellulaire des organismes. Il confère aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. Le collagène est une protéine composée de trois chaînes alpha polypeptidiques associées. Ces chaînes sont reliées par des liaisons hydrogènes entre l'hydroxylysine et l'hydroxyproline et des liaisons covalentes. Pouvant se combiner de différentes manières, on devrait en toute rigueur parler des collagènes. Chaque type de collagène possède une structure propre et se retrouve dans des organes particuliers. Par exemple, le collagène de type I intervient dans la formation de la peau, des tendons, des os et de la cornée, tandis que le type III se retrouve au niveau du système cardiovasculaire. Lorsque le collagène est partiellement hydrolysé, les trois brins de tropocollagène se dissocient. Ils forment ainsi la gélatine, un produit largement utilisé dans l'agroalimentaire. La gélatine a aussi été utilisée dans l'industrie pharmaceutique, en cosmétique et en photographie. Le collagène est utilisé pour l'ingénierie du tissu osseux. Il est souvent utilisé sous forme de membrane (CovaOrtho®) pour lutter contre les adhérences tissulaires. Mais étant d'origine animale (bovine ou porcine), il induit des réactions locales inflammatoires au niveau du site implantatoire.

**Les hydrogels :** sont des polymères insolubles dans l'eau et capables de constituer un gel avec un énorme pouvoir absorbant. En effet, ils peuvent parfois contenir jusqu'à 99% d'eau dans leur forme finale. Les produits obtenus possèdent un haut degré de flexibilité comparable aux tissus vivants et comme ils sont constitués en grande partie d'eau, ils sont naturellement compatibles avec ces tissus. Ils sont à base de silicone dans beaucoup de cas, mais du fait des réactions de siliconite au contact du tissu osseux, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à un autre type de gel : le gel d'alginate de calcium.

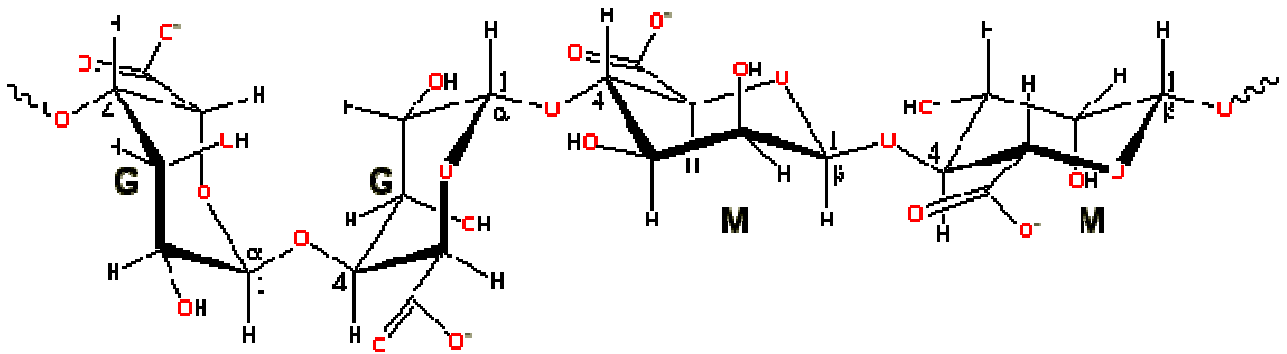
**Le gel d'alginate de calcium** est largement utilisé pour la régénération du cartilage pour ses propriétés biologiques (biocompatibilité, biodégradabilité, non toxicité, bonne porosité). Durant nos études notre choix s'est donc porté sur l'utilisation de ce gel d'alginate pour l'étude *in vivo*. En effet, l'utilisation de cet hydrogel permet en effet de conserver l'environnement tridimensionnel des cellules. Ce gel va permet non seulement d'intégrer les

cellules au moment de la gélification, mais aussi de garantir une répartition uniforme de ces cellules (Kuo *et al*, 2001).

Les deux réactifs pour former le gel d'alginate sont le calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) et l'acide alginique.

L'acide alginique est un polymère naturel constitué de deux unités monosaccharidiques :

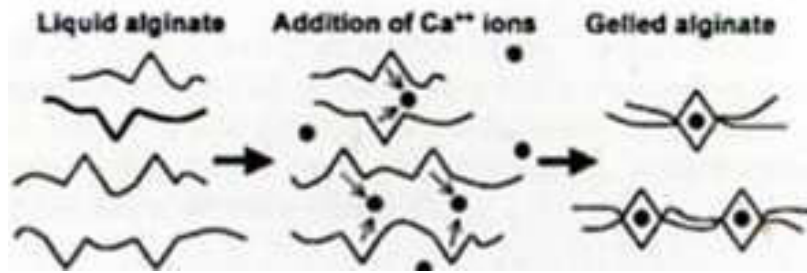
l'acide D-mannuronique (M) et d'acide L-gulonique (G) (Figure 20).



**Figure 20 : Structure stéréochimique d'une chaîne polymère d'acide alginique**  
(Grant *et al*, 1973)

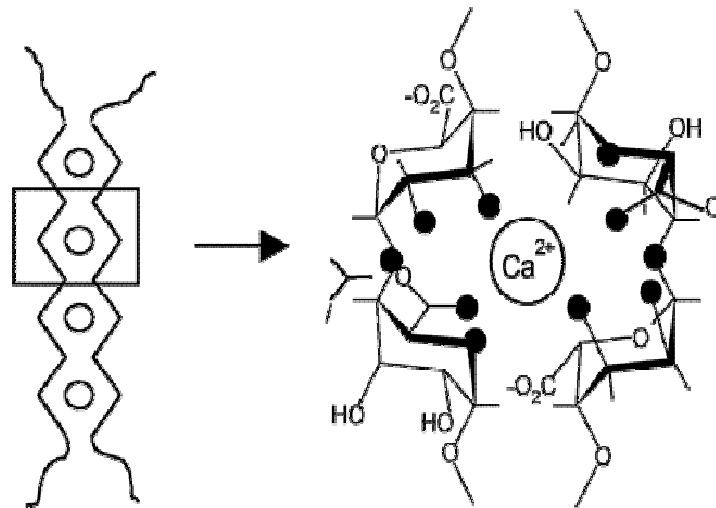
Avec un groupe carboxylique dans chaque unité M et G, l'alginate est un polyélectrolyte anionique hautement chargé à pH neutre ou basique. La composition en G et M de l'alginate est très variable et dépend de l'espèce d'algue marine dont il est extrait. Les propriétés de diffusion et les propriétés mécaniques d'un gel d'alginate, sont des paramètres critiques dans le choix d'une matrice d'immobilisation, elles dépendent essentiellement des caractéristiques physico-chimiques de l'alginate, comme sa composition chimique ou son poids moléculaire. Elles varient avec les conditions de gélification telles que la température ou le pH de la solution d'alginate.

En ce qui concerne la gélification (Figure 21), elle s'obtient par l'intermédiaire de cations divalents tels que  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour le tissu osseux ou cartilagineux, plusieurs études préfèrent le calcium, comme ce sera le cas dans notre expérience (Buttery *et al*, 2001).



**Figure 21 : Gélification de l'alginate lors de l'ajout de calcium  $\text{CaCl}_2$**   
(Grant *et al.*, 1973)

En présence des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , on assiste à une chélation induisant une structure en « boîte à œufs » spécifique du gel (Figure 22). Un des avantages de cet hydrogel est son utilisation pour encapsuler des cellules pendant le processus de gélification permettant ainsi une distribution et une répartition uniforme des cellules dans la construction (Kuo *et al.*, 2001).



**Figure 22 : Structure de la boîte à œufs** (Grant *et al.*, 1973)

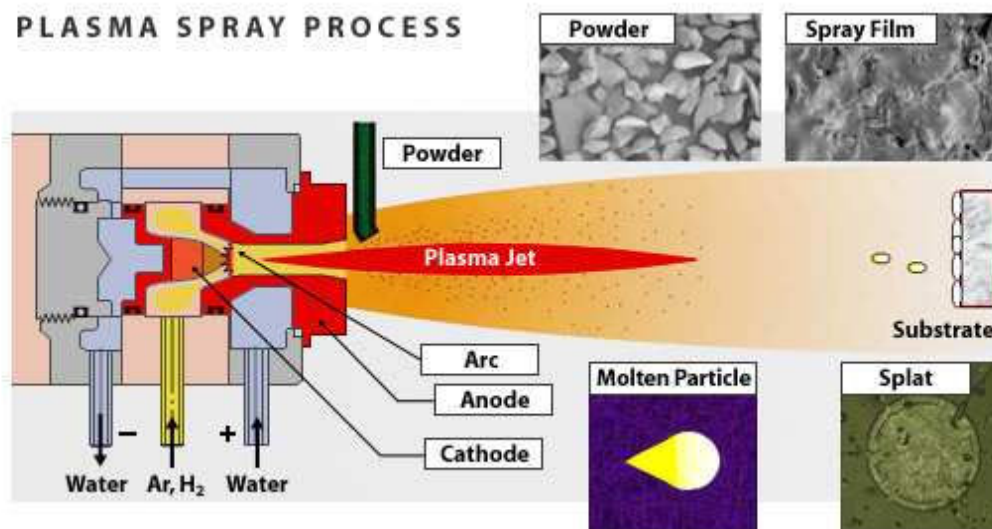
### ***V.3 Techniques de traitement et de fonctionnalisation des biomatériaux***

Il existe différentes techniques de traitement pour incorporer des principes actifs à la surface d'un biomatériau. Dans le cadre de nos études, nous avons d'une part utilisé des principes actifs comme l'hydroxyapatite et les nanotubes de carbone pour enrichir le biomatériau non dégradable (le titane) à sa surface par la technique de projection thermique à plasma chaud, puis d'autre part stocké des facteurs de croissance pour rendre actifs des biomatériaux résorbables (capsules et membranes) en leur sein par la technique de multicouches de polyelectrolytes.

### V.3.1 Le procédé de projection thermique par plasma chaud

a) **La projection plasma** ou *plasma spraying* est un procédé de revêtement des matériaux approuvé par la FDA (Campbell, 2003). Elle fait partie des techniques de projection thermique, qui permettent de déposer des matériaux (métalliques ou non-métalliques) en fusion ou semi-fusion sur un substrat (Fauchais *et al*, 2002). Tous les systèmes de projection thermique possèdent un gaz vecteur servant à accélérer et transporter jusqu'au substrat de fines particules (typiquement 5 à 100 micromètres) qui peuvent être à l'état liquide, pâteux voir solide. Ce gaz vecteur peut être aussi une source enthalpique, permettant de chauffer ces particules jusqu'au point de fusion, mais d'autres procédés utilisent aussi un arc électrique pour fondre le matériau.

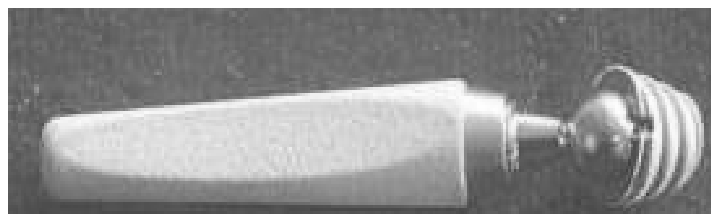
La projection plasma apparue dans les années 60, consiste à injecter une poudre dans un dard plasma, où elle est alors fondue puis projetée à grande vitesse vers la surface à revêtir. Les torches à plasma d'arc soufflé utilisent le confinement d'un arc électrique pour augmenter fortement sa température (supérieure à 20 000°K) de façon à générer un plasma à partir d'un gaz plasmagène (hélium, argon, nitrogène, hydrogène, air, oxygène) (Figure 23).



**Figure 23 : Technique de projection plasma utilisée pour le coating ou revêtement des implants orthopédiques**

Ce plasma sert ensuite à fondre et à accélérer le matériau à projeter. La fusion des grains de poudre est due aux très hautes températures existant dans le plasma qui rendent possible le dépôt de matériaux à point de fusion élevé. Les particules ainsi projetées sur le substrat s'écrasent selon plusieurs paramètres : leur vitesse, leur diamètre, leur état physique,

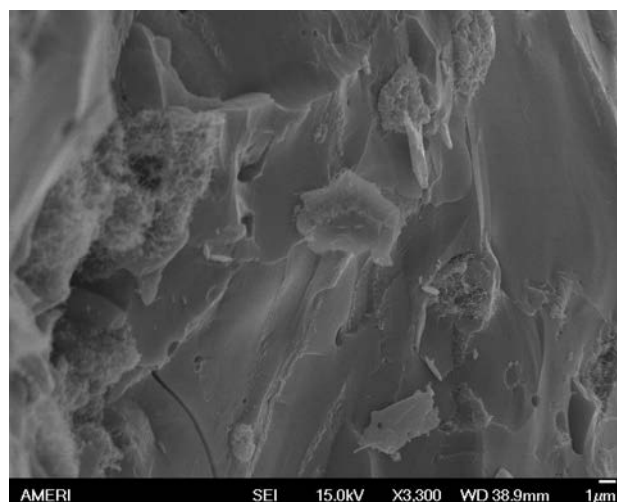
et leur température. On assiste successivement à la formation d'un "splat" qui va s'aplanir pour former une couche (*layer*) et ainsi le dépôt, on peut renouveler le passage du dépôt si besoin. L'accumulation des particules sur le substrat permet de réaliser le revêtement (*coating*). Un très grand nombre de matériaux sont utilisables avec cette technique en particulier, en forme de poudres, fils ou cordons. Tous matériaux peuvent être projetés. Cependant, les matériaux qui fondent en se décomposant tels que l'hydroxyapatite ou ceux qui n'ont pas de point de fusion, tel que le graphite doivent être préparés avec plus de précaution, soit par l'optimisation de paramètres de la projection (hydroxyapatite partiellement fondu) (Campbell, 2003), soit par une préparation de poudres avec mélange de NTC (Balani *et al*, 2007) ou avec des particules enrobées (graphite enrobé par nickel). Plusieurs matières organiques peuvent être projetées par les torches appropriées. Les métaux et les céramiques sont fréquemment employés, ils peuvent aussi être utilisés en composites pour modifier les propriétés du revêtement. Les domaines applicatifs sont larges, du simple zingage pour les infrastructures métalliques (ponts), aux applications de plus haute technologie comme dans les moteurs à réaction d'avion, dans le biomédical (prothèses) (Figure 24) (Campbell, 2003), les turbines à gaz, l'automobile, le nucléaire...



**Figure 24 : Prothèse en titane recouverte d'hydroxyapatite par projection thermique**

**b) L'hydroxyapatite** (HA) est utilisé comme revêtement dans l'industrie biomédicale depuis plusieurs décades pour les implants dentaires, maxillo-faciaux et orthopédiques. L'HA est le principal composant minéral de la MEC du tissu osseux sous forme de cristaux  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Or il a été démontré que les biomatériaux à base de calcium et de phosphate, comme l'HA, ont la capacité d'induire la formation de tissu osseux sur les implants orthopédiques (Campbell, 2003). Ils n'induisent pas la formation de tissu fibreux, mais plutôt la formation d'une fine couche d'os attachée à l'os pré-existant (Kitsugi *et al*, 1996). Ceci a amené à qualifier ce matériau de « bioactif » ou en d'autres termes de « *bone bonding* », à la vue de ses propriétés de créer des ponts avec le tissu osseux. Le concept de *bone bonding* sur des matériaux revient à Hench sur une surface réactive en verre et à Jarcho sur les matériaux

de type céramiques à base de phosphate et calcium (Jarcho, 1986). Ces matériaux ont le potentiel de recouvrir la surface d'un implant. On peut ainsi exploiter, d'une part les propriétés biologiques des céramiques en surface (biocompatibilité et potentiel de *bone bonding*) et d'autre part les propriétés mécaniques des substrats qui en sont recouverts (Wang *et al*, 2003), comme par exemple un alliage en titane. Bon nombre de méthodes ont été développées pour recouvrir d'HA des substrats, tels des alliages métalliques biomédicaux : techniques de déposition électrochimique, vapeur, trempage, électrophorèse, projection thermique ou *plasma spraying*. Mais actuellement la méthode de *plasma spraying* est la plus communément utilisée et la seule approuvée par la *FDA* pour recouvrir d'HA la surface des implants orthopédiques (Campbell, 2003). Ce procédé permet à très haute vitesse de projeter de la poudre d'HA en fusion à la surface de l'implant (Yu *et al*, 2003). Lors de l'impact avec le substrat, le matériel projeté se refroidit rapidement et forme une couche dense (*coating*), faite de couches impactées d'HA (Figure 25).



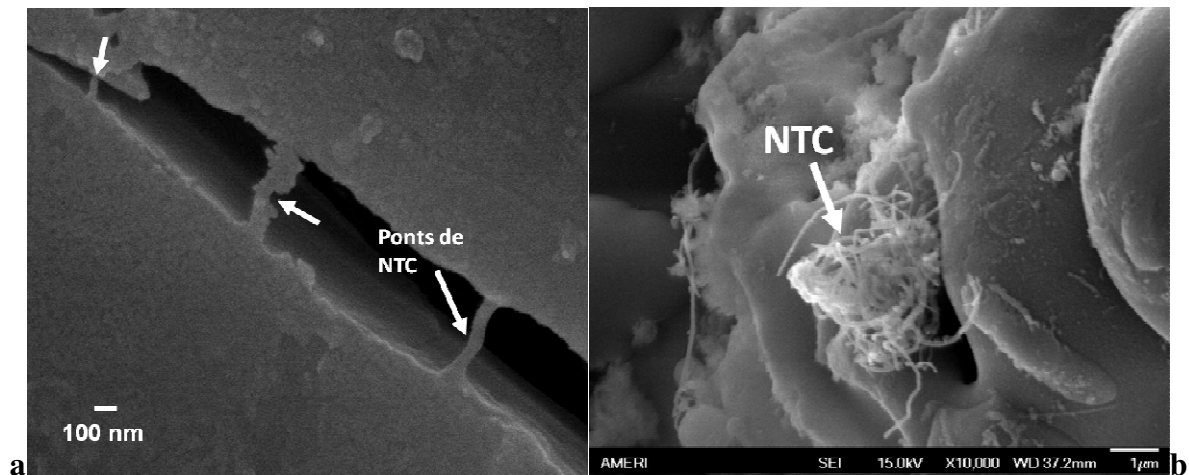
**Figure 25 : Image en MEB d'une couche de revêtement d'HA par plasma spraying**

Malheureusement les propriétés bien connues du revêtement par de l'HA sont une usure rapide et une pauvre résistance à la fracture (Tercero *et al*, 2009). Les problèmes, comme le descellement des prothèses articulaires recouvertes d'HA, continuent à survenir (Facca *et al*, 2011). Il existe donc encore une forte demande des chirurgiens orthopédistes pour développer des techniques de *coating* qui permettront d'accélérer l'induction osseuse autour des implants. Une des alternatives proposée est d'ajouter un autre biomatériau à projeter à la surface des implants pour contrebalancer les limites de l'HA, ce biomatériau étant les nanotubes de carbone.



**c) Les nanotubes de carbone** (NTC), forment l'un des quatre états organisés connus du carbone sur Terre, avec le graphite, le diamant et les fullerènes. Ils sont formés d'une ou plusieurs parois concentriques, où les atomes de carbone sont organisés en réseaux d'hexagones. Leurs dimensions vont de quelques microns à quelques dizaines de microns de longueur et leur diamètre est inférieur à quelques nanomètres. Ils sont employés dans diverses applications et principalement pour leurs propriétés mécaniques et électriques. Depuis la publication des travaux d'Iijima en 1991 (Iijima, 1991), un intérêt croissant s'est développé quant aux applications biomédicales des NTC, surtout concernant leur utilisation dans le renforcement de matrices de biomatériaux à cause de leurs propriétés mécaniques (Hwang *et al*, 2001), leur résistance à la traction, leur conductivité électrique et leur stabilité chimique. Une application particulière est leur utilisation dans les matériaux de type composite, contenant des NTC.

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse, l'utilisation des NTC peut mener à de nouveaux matériaux, qui peuvent soutenir la croissance des cellules osseuses ainsi que la formation d'un nouveau tissu osseux (Akasaka *et al*, 2006) et qui peuvent augmenter la résistance à l'usure et à la fracture des céramiques, telle l'HA (Balbani *et al*, 2007 ; Bakshi *et al*, 2007 ; Lahiri *et al*, 2010). L'utilisation des NTC permet d'accélérer la croissance osseuse (Price *et al*, 2003) et la précipitation des cristaux d'HA et donc d'induire la formation de ponts osseux avec la matrice osseuse (Akasaka *et al*, 2006; Usui *et al*, 2008 ; Niu *et al*, 2010) (Figure 26). Le nanorenforcement par des NTC augmente leur résistance à la fracture et à l'usure (George *et al*, 2005) et l'ostéointégration des implants recouverts d'HA (Lahiri *et al*, 2009). De précédentes études *in vitro* concernant le revêtement mixte HA-NTC (Figure 26) ont démontrées l'amélioration des résultats tribologiques (Balani *et al*, 2007) et leur biocompatibilité avec les ostéoblastes et les macrophages (Lahiri *et al*, 2011). Mais au contact de l'os *in vivo*, les propriétés du revêtement composite HA-NTC sur la consolidation osseuse et l'induction osseuse n'ont pas été encore réellement explorées. Seules des études *in vivo* ont été réalisées avec le composite HA-NTC au niveau musculaire sur des rats (Li *et al*, 2007) ou avec seulement des NTC sur des crânes (*calvaria*) de rats ou des diaphyses de tibia (Kasai *et al*, 2011 ; Usui *et al*, 2008 ; Narita *et al*, 2009 ; Sakagushi *et al*, 2008) démontrant une bonne biocompatibilité et leur pouvoir ostéoinducteur.



**Figure 26 : Revêtement mixte HA et NTC par projection thermique de plasma chaud**  
*Ponts de NTC (a) au sein de la matrice d'HA, permettant d'augmenter la résistance à la fracture et à l'usure du dépôt composite HA-NTC (Facca et al, 2011) et image en MEB (b)*

L'utilisation des NTC reste très controversée de nos jours et soulève des questions concernant leur sécurité en terme de biomatériaux (Fioritto, 2008 ; Kostarelos *et al*, 2010 ; Ren *et al*, 2010). Leur potentiel de toxicité tissulaire a été reporté dans divers tissus : splénique, hépatique, ou pulmonaire (Kagan *et al*, 2010 ; Muller *et al*, 2008), mais aussi leur potentiel de nanotoxicité cellulaire (Muller *et al*, 2008; Lee *et al*, 2010). Spécialement leur effet sur les macrophages (Cheng *et al*, 2009; Fioritto, 2008), pourrait être à l'origine d'un ralentissement de la consolidation osseuse autour des implants orthopédiques (Kim *et al*, 2009). De taille inférieure à 2 nm, les NTC peuvent rentrer dans la cellule par endocytose, et entraîner une interaction avec les voies intracellulaires de signalisation et une augmentation des phénomènes d'inflammation. Des NTC ont ainsi été observés par MET (Microscopie Electronique à Transmission) à l'intérieur du cytoplasme et du noyau cellulaires (Cherukuri *et al*, 2004). Les NTC peuvent causer une phagocytose incomplète *in vivo* (Sakagushi *et al*, 2008) et ainsi entraîner un stress oxydatif et une mort cellulaire *in vitro* (Cheng *et al*, 2009). D'un autre côté, il a été démontré que les NTC avaient une excellente biocompatibilité avec le tissu osseux (Usui *et al*, 2008) implantés *in vivo* (Sakagushi *et al*, 2008). Enfin, l'utilisation des NTC présente un avenir prometteur, quant à leur double propriété : de fonctionnalisation et d'internalisation dans le cytoplasme cellulaire (Kostarelos, 2010). En effet, on peut chimiquement fonctionnaliser les NTC par cycloaddition ou par oxydation acide (Kostarelos, 2010 ; Prato et al, 2003). Ils pourront vraisemblablement être utilisés comme système de transport (Prato *et al*, 2003) avec libération de principes actifs via leur large distribution tissulaire (Singh *et al*, 2006), à visée thérapeutique et diagnostique ; reste à évaluer leur balance bénéfiques/risques au long terme.

### V.3.2 La technique d'électrofilage

Durant notre travail, nous nous sommes intéressés aux biomatériaux résorbables capables de mimer la MEC, et en particulier aux implants composés de nanofibres synthétiques, afin de remplacer les implants à base de collagène qui induisent des réactions inflammatoires. La technique d'électro-filage nous a permis de concevoir ces implants résorbables 3D.

**(i) Historique :** la technique d'électrofilage ou « electrospinning » est un procédé qui permet de fabriquer des fibres polymères ayant une dimension nanométrique ou micrométrique. Cette technique est connue depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle. Zeleny en 1917 observa le phénomène d'*electrospraying* (Zeleny, 1917) et Taylor en 1964, analysa les conditions sous lesquelles une goutte est déformée par un champ électrostatique (Taylor, 1964). Ces dernières années, le nombre de publications relatant l'utilisation ou le développement du procédé d'*electrospinning* a augmenté. Cela pouvant s'expliquer par le nombre important d'applications de l'*electrospinning*. Les micro- ou nano- fibres peuvent être employées dans des domaines variés tels que le textile, la filtration et bien entendu dans les sciences et technologies biomédicales comme l'ingénierie tissulaire.

**(ii) Principe :** l'*electrospinning* est un procédé issu de l'*electrospraying* qui en diffère de par l'utilisation de solutions de polymère concentrées. Il permet ainsi, sous l'effet des forces électrostatiques créées par l'application d'un champ électrostatique, de déposer des fibres ayant un diamètre pouvant varier de la centaine de nanomètres à plusieurs micromètres. Le matériel employé reste basique, il est généralement constitué par un pousse-seringue, une seringue, un tuyau, une aiguille et une alimentation haute-tension. Le principe du procédé est le suivant : une solution de polymère est acheminée d'un réservoir (une seringue) vers une aiguille conductrice où un champ électrostatique est appliqué. Sous l'effet des forces électrostatiques se créant au sein de la solution de polymère, la goutte de polymère, en sortie de l'aiguille, s'allonge formant un cône dit de Taylor. Si le champ a atteint une valeur seuil, les forces électrostatiques vont vaincre les forces de tension de surface de la goutte de polymère provoquant la formation d'un jet. La formation de ce jet est principalement due au mouvement des charges libres à la surface et dans la solution de polymère. En d'autres mots, la force de traction s'appliquant sur le polymère en solution, générée par ce procédé, provient des interactions électriques entre le champ externe appliqué et les charges électriques contenues et acheminées par le jet. Lorsque les charges libres de la solution de polymère

migrent en réponse au champ électrostatique, elles transfèrent très rapidement une force au polymère et provoquent la déformation du jet. Le jet peut être décomposé en quatre parties différentes (Reneker *et al.*, 1996). On distingue en effet la base qui est constituée par le cône de Taylor, le jet, la zone d'instabilité du jet, et la zone de déposition appelée plus couramment collecteur.

**(iii) Limites :** il existe deux principales limitations de ce procédé d'*electrospinning* pour l'ingénierie tissulaire. La première concerne les dimensions spatiales des scaffolds fabriqués, la seconde provient du manque de contrôle de la taille et de la géométrie des pores qui sont formés par l'enchevêtrement des fibres. L'*electrospinning* permet uniquement de fabriquer des structures bidimensionnelles 3D (membranes). En effet, après un certain temps de déposition, la couche fibreuse se trouvant sur le collecteur empêche l'évacuation des charges, les fibres sont donc chargées ce qui provoque des interactions répulsives entre elles. Cela a pour effet un élargissement de la zone de déposition. Il est quasi impossible de fabriquer une membrane de plusieurs millimètres d'épaisseur. Ainsi, son utilisation, en l'état, en ingénierie tissulaire est limitée. Il est par exemple peu probable qu'à terme, on puisse traiter des comblements osseux de grande dimension (supérieure à plusieurs millimètres) par des membranes produites par ce procédé. Par contre, ces membranes semblent plus adaptées aux pertes de substances cartilagineuses de plus petites dimensions et en 2D.

Une autre conséquence de cette bidimensionnalité est la faible résistance à la rupture de ces membranes (de 10 à 100 N). Matthews *et al.* ont testé mécaniquement des membranes de collagène fabriquées par *electrospinning* (Matthews *et al.*, 2002). L'épaisseur de ces membranes étant relativement faible (200  $\mu\text{m}$ ), la force à rupture se situe à 1 N, ce qui est extrêmement faible comparé aux performances des tissus collagéniques humains.

La taille des pores est un paramètre important pour l'ingénierie tissulaire puisqu'elle va promouvoir ou non la migration cellulaire. Aussi, si les pores sont trop petits, les cellules ne pourront pas coloniser l'épaisseur de la membrane. On estime que le diamètre minimal requis pour permettre une migration tissulaire est de l'ordre de la dizaine de micromètres (Zhang *et al.*, 2010). Bien que le contrôle du diamètre des fibres soit une propriété qui peut être ajustée assez facilement, il est difficile de contrôler la taille des pores formés par l'enchevêtrement des fibres. En dernier lieu, l'utilisation de solvant pour dissoudre les polymères est un désavantage de cette technique. En effet, un polymère en solution dans un solvant organique ne peut être électrospinné directement sur le corps humain si ce solvant est toxique. Cependant, ce désavantage est commun avec un nombre important de procédés de fabrication

de scaffold. Néanmoins, l'*electrospinning* est une technique hautement attractive pour les applications en ingénierie tissulaire de par sa relative facilité de mise en oeuvre, de par le grand nombre de polymères, et naturels, et synthétiques pouvant être électrospinnés. L'*electrospinning* offre la possibilité d'ajuster la morphologie et les diamètres des fibres fabriquées.

**(iv) Fabrication des membranes nanofibreuses :** ces membranes sont obtenues par l'*electrospinning*, les fibres qui les composent peuvent posséder un diamètre différent, ce sont généralement des cylindres pleins, mais elles peuvent aussi être creuses (ce sont alors des nanotubes), être poreuses, adopter une configuration hélicoïdale, ou même avoir des embranchements. Ainsi, il convient de clarifier sur quels aspects les paramètres du procédé vont influencer. Les deux principales propriétés des fibres sont, d'une part, le diamètre, et d'autre part, la présence de gouttes de polymères reliées par des fibres. Ces gouttes sont communément appelées des *beads*. Des paramètres vont influencer sur ce procédé et sur la morphologie et le diamètre des fibres (Tableau 2).

**Tableau 2 : Paramètres permettant d'ajuster le diamètre des fibres**

	Diamètre des fibres	Formation de <i>beads</i>	Procédé
Concentration	++++	++++	Si trop concentrée, déposition impossible
Solvant	++++	++++	Solvant à grande conductivité, procédé plus stable
Débit	+++	-/+	Permet la fusion des fibres aux points de contact. Si débit important, stabilité amoindrie
Distance de déposition	--	++	Impact sur la taille de la zone de déposition (petite distance, petite aire de déposition)
Champ électrique	--	+	Risque de formation d'arc électrique pour des champs trop importants

*Il existe différentes techniques pour fonctionnaliser les biomatériaux par incorporation de principes actifs. Afin de rendre le biomatériau actif on peut adsorber un principe actif. Cependant, une liaison covalente réversible est très intéressante mais nécessite une chimie compliquée pour une application clinique. Durant notre travail, nous avons opté pour la technique des multicouches de polyélectrolytes, qui va nous permettre de fabriquer des réservoirs actifs dans un millefeuille moléculaire recouvrant les biomatériaux.*

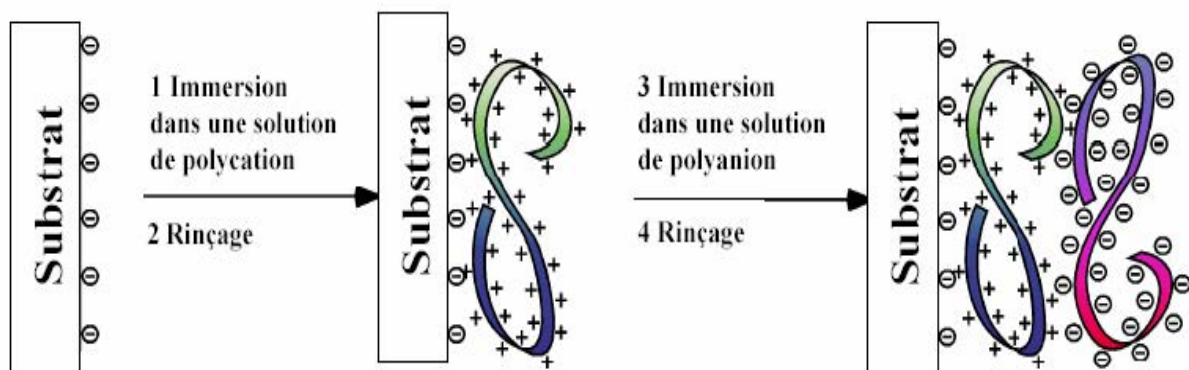
### V.3.3 Technique des multicouches de polyélectrolytes

A des fins de reconstitution du tissu osseux, en plus de la matrice tridimensionnelle (gel, scaffolds) et des cellules osseuses ou cartilagineuses, on a besoin de principes actifs (facteurs de croissance par exemple) indispensables à la différenciation cellulaire. Une des approches utilisée au sein de notre laboratoire INSERM U977, est une adsorption alternée de polyélectrolytes chargés positivement (polycations) et négativement (polyanions) qui mène à la construction d'un film de multicouches (ou millefeuille moléculaire). Ce film peut être fonctionnalisé par l'insertion de protéines ou de polyélectrolytes sur lesquels ont été couplés de façon covalente des peptides interagissant avec les récepteurs cellulaires (Benkirane-Jessel *et al*, 2003 ; Chluba *et al*, 2001 ; Dierich *et al*, 2007 ; Jessel *et al*, 2006). Dans ce cas de figure, le principe actif peut être incorporé au sein d'un film de polyélectrolytes et est libéré progressivement lors de la dégradation du film : le film constitue le rôle d'un réservoir actif.

Un polyélectrolyte est un polymère chargé positivement ou négativement. Il peut être synthétique, polypeptidique ou polysaccharidique. Durant cette étude, nous avons utilisé des polypeptides biocompatibles, biodégradables et non toxiques : il s'agit de l'énantiomère (ℓ) de la poly-lysine (PℓL) chargé positivement et de l'énantiomère (ℓ) du poly acide glutamique (PℓGA), chargé négativement.

Le film se forme grâce aux interactions électrostatiques entre poly-anion et poly-cation. Nous avons utilisé la méthode de dépôt couche par couche " LbL " (Layer by Layer) qui est basée sur les interactions électrostatiques existant entre des espèces anioniques et cationiques adsorbées alternativement sur un support chargé. Le principe est décrit schématiquement dans la figure suivante (Figure 27). Un substrat chargé négativement est mis au contact d'une solution de polycations pendant un temps donné de 5 à 30 min. Les polycations s'adsorbent sur la surface et les molécules non adsorbées sont éliminées par simple rinçage. Après rinçage, la surface est donc chargée positivement car il y a surcompensation de charges lors de l'adsorption (Decher, 1997). Lorsque le substrat est mis au contact avec une solution de polyanions, ceux-ci peuvent également interagir et s'adsorber sur la surface. Cette adsorption est suivie d'une étape de rinçage à l'issue de laquelle la surface est chargée négativement. La construction est reproduite n fois jusqu'à l'obtention d'un film d'épaisseur voulue. La surcompensation de charge après chaque dépôt a été mise en évidence par des mesures du potentiel zêta et constitue le moteur de la construction des films multicouches. En conclusion, le film de multicouches se forme grâce aux interactions électrostatiques entre polyanions et

polycations. Ce film peut être fonctionnalisé en y insérant des substances actives telles que des protéines, des peptides ou des médicaments (Benkirane-Jessel *et al*, 2004) (Jessel *et al*, 2004). Ce genre de film peut être construit sur une surface plane ou en utilisant des particules dégradables ou non dégradables. La construction de ces films multicouches sur des particules non dégradables (silice par exemple) peut nous permettre par dissolution du corps (silice) de fabriquer des capsules de multicouches (Caruso *et al*, 1998), qui peuvent être bioactives et nanofonctionnalisées par des facteurs de croissance osseux (Facca *et al*, 2010).



**Figure 27 : Schéma de la construction d'un film de PEM**

*PEM = multicouches de polyélectrolytes.*

*Par adsorptions successives de polycations et de polyanions sur un substrat : le substrat (ici chargé négativement) est initialement immergé dans une solution de polycations (1). Après rinçage (2) l'ensemble est alors immergé dans une solution de polyanions (3) et de nouveau rincé (4). Cette construction est reproduite n fois jusqu'à l'obtention d'un film d'épaisseur voulue (Decher, 1997).*

La régulation de la formation osseuse fait appel essentiellement à des facteurs de croissance. Ces facteurs de croissance jouent un rôle dans le recrutement et la prolifération des ostéoblastes. Ils sont synthétisés par les cellules de la lignée ostéoblastique elles-même, puis sont incorporés dans la MEC. Ainsi la MEC sert de réservoir à ces facteurs les protégeant de la protéolyse. On distingue :

- **les facteurs de croissance de transformation bêta** (TGF- $\beta$ ) -I, -II & -III, qui sont produits par les ostéoblastes, et qui possèdent des sites récepteurs à ces facteurs. Le TGF- $\beta$  a un effet anabolique qui entraîne une augmentation de la production de MEC, l'adhérence, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, accompagné d'une inhibition de la dégradation de la MEC (Oberts *et al*, 1990). Le TGF stimule ainsi le recrutement des ostéoblastes et la production de la MEC, jouant un rôle local sur la formation et le remodelage

osseux (Chen *et al*, 1994). *In vitro*, le TGF- $\beta$  a un effet négatif sur la résorption osseuse et en cas de fracture son expression est augmentée (Baron, 2001).

• **les protéines morphogéniques osseuses** (BMP) jouent un rôle dans la croissance cellulaire et dans la formation osseuse. C'est Urist en 1965, qui introduit le concept de néoformation osseuse à partir d'une substance de l'os (Urist, 1980). Il observe alors la formation d'os après implantation de substance osseuse déminéralisée dans un muscle. Les BMP sont responsables de ce phénomène aussi nommé ostéoinduction. Présentes dans la MEC, six protéines de la famille des BMP (BMP 2 à 7) présentent une forte homologie de séquence avec le TGF- $\beta$  -I et ont des effets proches de ceux des TGF-  $\beta$  -I et II. Certaines BMP stimulent la prolifération cellulaire des ostéoblastes en culture. Les BMP 2, 6 et 9 agissent sur la différenciation des progéniteurs en préostéoblastes, tandis que les BMP 4 et 7 agissent sur la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes. Seules deux BMP recombinants sont utilisées en clinique : rhBMP-2 et rhBMP-7 (Chen *et al*, 1994), pour des indications de cure de pseudarthrose des os longs (Obert *et al*, 2007). Mais leur utilisation soulève des doutes, quant à une éventuelle immunisation (anti-BMP) et sur d'éventuels développements tumoraux en raison de leur action sur d'autres tissus.

• **les autres types de facteurs de croissance osseux** sont :

(i) les FGF (Fibroblast Growth Factors) sécrétés par les ostéoblastes et jouant un rôle dans l'angiogénèse. Ils ont une action mitogène sur les cellules mésenchymateuses et sur la prolifération chondrocytaire et permettent une restauration des propriétés mécaniques de l'os par activation des ostéoclastes.

(ii) l'hormone de croissance hypophysaire ou « Growth Hormone » (GH) qui est active des cellules cibles au niveau du cartilage de croissance et les ostéoblastes qui vont alors sécréter des « Insuline-like Growth Factors » (IGF). Les IGF-I & II stimulent la prolifération des ostéoblastes, les effets sur les ostéoblastes dépendant de protéines porteuses : les *Binding Proteins* (BP).

(iii) le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) qui *in vivo* augmenterait la différenciation ostéogénique (Baron, 2001) (Trojani *et al*, 2008).



## **CHAPITRE II : OBJECTIFS DE LA THESE**

L'objectif essentiel de notre travail a été le développement de biomatériaux nanostructurés capables d'induire du tissu osseux et/ou du tissu ostéo-articulaire.

La première approche de notre travail a été l'amélioration de l'ostéointégration des implants orthopédiques. En effet l'un des espoirs en chirurgie orthopédique est d'accélérer l'attachement à l'os néoformé des prothèses articulaires après leur implantation. En clinique, l'une des craintes du chirurgien reste le descellement prothétique dans le temps (Materson *et al*, 2012). De nos jours le titane est couramment employé dans la modélisation des implants orthopédiques, sous sa forme pure ou sous forme d'alliage (Campbell *et al*, 2003). Ses propriétés bien connues sont : sa résistance, sa rigidité, sa légèreté et sa relative inertie. Depuis plusieurs décennies, une des approches pour augmenter la formation de l'os autour du titane a été de recouvrir sa surface par de l'hydroxyapatite (HA) (Fukuoka *et al*, 1988). Mais les échecs d'ostéointégration persistent malgré ce traitement de surface (Wang *et al*, 2009). L'idée a donc été d'ajouter des nanotubes de carbone (NTC) à l'HA projetée par la technique de « plasma spraying », approuvée par la FDA (Campbell *et al*, 2003), afin d'augmenter l'induction osseuse autour des implants en titane, ainsi nanofonctionnalisés. Nous avons réalisé un revêtement de surface composite en ajoutant des nanotubes de carbone (NTC) à l'hydroxyapatite projetée, à des fins d'amélioration de l'induction osseuse autour des prothèses en titane. Après une étude biologique et tribologique satisfaisante *in vitro*, nous avons testé *in vivo* nos implants ainsi nanostructurés. Dans cette étude *in vivo*, notre objectif était de démontrer, que l'adjonction de NTC à l'HA dans le traitement de surface des implants en titane augmentait leur ostéointégration, par rapport à des implants en titane nus, ou simplement recouverts d'HA, et cela sans aucune toxicité sur le tissu osseux. Nous pourrions envisager grâce à cette fonctionnalisation de surface, dans le futur d'utiliser les NTC pour renforcer le revêtement de surface des implants orthopédiques.

La deuxième approche a consisté à développer des capsules nanostructurées et fonctionnalisées, pouvant induire une différenciation de cellules souches embryonnaires en lignée osseuse. Une des approches complètement originale utilisée au sein de l'unité INSERM U977 de « Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire », est une adsorption alternée de polyélectrolytes chargés positivement (polycations) et négativement (polyanions), qui mène à la construction d'un film de multicouches de polyélectrolytes. Ces films peuvent être fonctionnalisés par l'insertion de protéines (ligands) (Benkirane-Jessel *et al*, 2003) (Dierich *et al*, 2007) ou de peptides couplés aux polyélectrolytes de façon covalente, qui interagissent

avec les récepteurs cellulaires (Benhirane-Jessel *et al*, 2004) (Chluba *et al*, 2001) (Schultz *et al*, 2005). Il a été démontré, que des facteurs de croissance (BMP-2 et TGF- $\beta$ 1) incorporés dans un film de surface plane de multicouches de polyélectrolytes pouvaient induire, *in vitro* une différenciation de cellules souches en cellules osseuses ou cartilagineuses (Dierich *et al*, 2007). Cette stratégie intéressante, nécessite néanmoins pour une utilisation *in vivo*, l'implantation du substrat sur lequel nous pouvons construire le film de multicouches et incorporer les facteurs de croissance. Nous avons choisi un système de particules sphériques, construit sur le modèle couche par couche avec du poly- $\ell$ -glutamic acid (PGA) et du poly- $\ell$ -lysine (PLL) incorporant à la fois BMP-2 et TGF- $\beta$ 1. Puis après dissolution du corps de la particule, on obtient une capsule. Notre objectif a été de démontrer, que ces capsules étaient capables d'induire à la fois *in vitro* comme *in vivo*, la formation de tissu osseux à partir de cellules souches embryonnaires différenciées via 2 facteurs de croissance (Facca *et al*, 2009).

La troisième approche de notre travail a été de nous intéresser à la régénération de la région ostéochondrale, car la dégénérescence arthrosique est un problème de santé publique (Lévy *et al*, 1993). Cette dernière stratégie a consisté à utiliser des membranes nanofibreuses fabriquées par méthode d'*electrospinning* approuvée par la FDA (Kenawy *et al*, 2003), sur lesquelles on a adsorbé un film de multicouches de polyélectrolytes fonctionnalisés (Benkirane-Jessel *et al*, 2005). Nous avons construit des membranes bioactives et vivantes, car contenant des nanoréservoirs actifs, sous forme de facteurs de croissance (BMP-2) encapsulés dans le film de multicouches, et des cellules primaires humaines. Notre but a été de définir les caractéristiques de cet assemblage nanostructuré capable d'induire des néotissus ostéo-articulaires. Nos objectifs spécifiques ont été de produire des assemblages bioactifs à libération prolongée de BMP-2, et d'induire une régénération cartilagineuse au site de l'implantation, en utilisant ce même biomatériau vivant par incorporation de cellules ostéoblastiques et chondrocytaires. La méthodologie proposée dans ce projet est innovante car elle a permis de varier la composition du biomatériau tuteur durant son édification en y incluant différents types cellulaires. Nous avons voulu savoir si cet assemblage, testé *in vitro* puis *in vivo*, était capable d'induire une unité os-cartilage et pouvait être utilisé pour remplacer un défaut traumatique ou dégénératif articulaire.

*Au terme de ce travail, notre objectif a été de fonctionnaliser trois types différents de biomatériaux nanostructurés, utilisables en chirurgie orthopédique et traumatologique à des fins d'induction de la formation de tissus osseux, cartilagineux et de la zone ostéochondrale.*

## **CHAPITRE III : RESULTATS & DISCUSSIONS**

**I - Fonctionnalisation des implants en titane (Publication n°1)**

**“ In vivo osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants ”**

FACCA S, LAHIRI D, FIORETTI F, MESSADEQ N, BENKIRANE-JESSEL N,  
AGARWAL A. *ACS Nano*, 2011, 5, 4790-9

## ***I.1 Résumé du travail***

### **Objectifs**

De nos jours, le titane est couramment employé dans l'industrie biomédicale et dans la modélisation des implants orthopédiques, sous sa forme pure ou sous forme d'alliage (Campbell, 2003). Les propriétés du titane sont bien connues : sa résistance, sa rigidité, sa légèreté et sa relative inertie. Depuis plusieurs décennies, une des approches pour augmenter la formation d'os autour du titane a été de recouvrir sa surface par de l'hydroxyapatite (HA). Mais les échecs d'ostéointégration et les complications de type descellement de prothèses (Masterson *et al*, 2012), persistent malgré ce traitement de surface, car l'HA présente une faible résistance à l'usure et à la fracture (Wang *et al*, 2009). Les nanotubes de carbone (NTC) découverts par Iijima en 1991 (Iijima, 1991) présentent des propriétés intéressantes pour une application biomédicale : ils sont capables de renforcer la fragilité de l'HA, ils ont un coefficient de Young élevé (Troiani *et al*, 2003) et une importante résistance à la traction (Yu *et al*, 2000). L'idée a donc été de réaliser un revêtement de surface composite en ajoutant des nanotubes de carbone à l'hydroxyapatite projetée, à des fins d'amélioration de l'induction osseuse autour des implants titane. Après des études tribologiques (Balani *et al*, 2007) et biologiques (Lahiri *et al*, 2011) satisfaisantes *in vitro*, nous avons testé *in vivo* et *in situ* nos implants en titane ainsi nanofonctionnalisés en surface.

### **Méthodes**

Nos implants en alliage titane Ti-6Al-4V ont été traités en surface par la technique de projection thermique à plasma chaud (*plasma spraying*), approuvée par la FDA (Campbell, 2003). Différents types ont été implantés *in vivo* pendant un mois dans des fémurs de souris (sous forme de billes de 1 mm de diamètre) et chez le rat (sous forme de cylindres de 2.5 mm de diamètre et 10 mm de longueur). Trois types d'implants ont été utilisés : en titane nu, en titane recouvert d'hydroxyapatite et en titane recouvert d'HA et de NTC à 4 wt %. La biocompatibilité de ces implants a été étudiée sur l'os adjacent et néoformé par des méthodes radiologiques, histologiques, de microscopie électronique et leurs propriétés biomécaniques par nanoindentation.

## Résultats principaux

Concernant les implants en titane nanostructurés recouverts d'HA et de NTC, d'un point de vue macroscopique, nous n'avons constaté ni infection, ni inflammation et aucune ostéolyse périphérique. D'un point de vue histologique et microscopique, le tissu osseux aussi bien induit autour de ces implants qu'à distance, était strictement normal. Nous n'avons visualisé aucune migration des NTC, ni d'effets délétères des NTC notamment sur les macrophages. Enfin, d'un point de vue mécanique, le module d'élasticité de l'os néoformé autour des implants composites HA-NTC était supérieur à celui des implants recouverts simplement d'HA et identique à l'os natif sur des mesures faites à distance de l'implant.

## Conclusions du travail

L'un des espoirs en chirurgie orthopédique est d'accélérer l'intégration des implants orthopédiques à l'os néoformé, car l'une des craintes reste le descellement prothétique dans le temps. Nous rapportons ici les résultats prometteurs de la première étude *in vivo*, où nous avons testé *in situ* l'effet des NTC combiné à celui de l'HA sur le tissu osseux. Nous avons obtenu grâce aux NTC la néoformation d'un os biologiquement compatible et mécaniquement plus solide autour des implants composites. Dans cette étude *in vivo* nous avons démontré, que l'adjonction de NTC à l'HA dans le traitement de surface des implants en titane augmentait leur ostéointégration, par rapport à des implants simplement recouverts d'HA et cela sans aucune cytotoxicité. Nous pouvons donc dans le futur, envisager d'utiliser les nanotubes de carbone pour renforcer le revêtement par hydroxyapatite des implants orthopédiques.

**Mots clés :** titane, hydroxyapatite, nanotubes de carbone, ostéointégration.

*Ce travail a été effectué en collaboration avec le laboratoire de Nanomécanique et Nanotribologie et de Tribologie Haute Température, Département de Mécanique et d'Ingénierie des Matériaux, Université Internationale de Floride du Professeur A. Agarwal.*

# In Vivo Osseointegration of Nano-Designed Composite Coatings on Titanium Implants

Sybille Facca,<sup>†,‡,§,¶</sup> Debrupa Lahiri,<sup>†,¶</sup> Florence Fioretti,<sup>†,-1</sup> Nadia Messadeq,<sup>‡</sup> Didier Mainard,<sup>¶</sup> Nadia Benkirane-Jessel,<sup>‡,¶,\*</sup> and Arvind Agarwal<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup>Plasma Forming Lab and Nanomechanics and Nanotribology Lab, Department of Mechanical and Materials Engineering, Florida International University, Miami, Florida 33174, United States, <sup>‡</sup>Biomatériaux et Ingénierie tissulaire, Faculté de Médecine, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 977, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France, <sup>§</sup>Department of Hand Surgery, Strasbourg University Hospitals, 10 Avenue Achille Baumann, 67403 Illkirch Cedex, France, <sup>-1</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>¶</sup>IGBMC, Illkirch, France, and <sup>¶</sup>Centre d'Ortopédie de Nancy, Hôpital Central, and UMR 7561, CNRS-Université Henri Poincaré Nancy I, 29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 54000 Nancy, France. <sup>\*</sup>These authors contributed equally to this work.

Hydroxyapatite (HA) is used in the biomedical industry as the coating for titanium implants. HA is also used as the structural material for dental, maxillofacial, and orthopedic implants,<sup>1,2</sup> but HA is known to display rapid wear and failure due to poor fracture toughness.<sup>3</sup> Therefore, problems such as loosening of arthroplasty prostheses continue to scare surgeons. Hence, there is still a large demand for the acceleration of new bone induction around implants for improved osseointegration.

Carbon nanotube (CNT), first reported in 1991,<sup>4</sup> is a potential reinforcement for brittle hydroxyapatite, as it exhibits high Young's modulus<sup>5-7</sup> and tensile strength.<sup>8</sup> CNTs are being extensively researched as reinforcement for improving the fracture toughness and wear resistance of brittle ceramics, such as HA<sup>9-12</sup> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.<sup>13-15</sup> Though biocompatibility of HA is in universal agreement, the same is not true for CNT. The cytotoxicity of CNT is still in debate with contradictory reports by different research groups.<sup>16-23</sup> However, CNTs have been found to aid in accelerated bone growth and apatite precipitation and induce bonding and reinforcement with the bone matrix.<sup>24-27</sup> *In vitro* studies have shown the HA-CNT composites possess improved biocompatibility with osteoblasts<sup>9,10,28</sup> and macrophages.<sup>10</sup> However, *in vivo* response of HA-CNT composite-coated titanium implants in bones has never been explored. There are few *in vivo* studies performed with bare CNTs, but they are restricted to ectopic bone induction, tibial diaphysis, or mice skull.<sup>24,27,29,30</sup> CNTs help in accelerated new bone growth and guided bone regeneration in the case

**ABSTRACT** This is the first *in vivo* study of plasma-sprayed carbon nanotube (CNT)-reinforced hydroxyapatite (HA) coating on titanium implants embedded in rodents' bone. No adverse effect or cytotoxicity of CNT addition on bone tissues and cells was observed. Normal bone growth was observed around HA-CNT-coated implants. CNT addition induces higher osseointegration as compared to HA. Elastic modulus of new bone was compared with the modulus of HA-CNT/bone interface to understand the mechanical integrity of the implant.

**KEYWORDS:** hydroxyapatite · carbon nanotubes · osseointegration · bone induction *in vivo* · elastic modulus · titanium implants

of defect recovery.<sup>24,27</sup> There is only one report on *in vivo* study of the sintered HA-CNT composite, which was performed by implanting in a rat muscle tissue but not the bone.<sup>31</sup> After 14 days of implantation, the muscle tissues look similar to natural undamaged tissue, which indicates recovery and no cytotoxic effect.<sup>31</sup>

This study reports *in vivo* investigations of HA-CNT-coated Ti-6Al-4V alloy (hereafter referred as titanium) implants of different geometries which were embedded in mice and rats. The effect of CNT addition to HA on bone healing and bone induction is elucidated. The elastic modulus of the newly grown bone was measured and compared with the coating and implant to qualitatively compare strain at the interfaces. A very sharp and large difference in the elastic modulus between the implant and bone can create a large difference in strain at the interface, resulting in failure. This study encompasses all those variables (*e.g.*, *in vivo* bone implantations, HA coating, CNT reinforcement to HA, real-life titanium alloy implant, and mechanical properties of the new bone and multiple interfaces), which

\*Address correspondence to agarwala@fiu.edu, nadia.jessel@medecine.u-strasbg.fr.

Received for review February 24, 2011 and accepted May 19, 2011.

Published online 10.1021/nn200768c

©XXXX American Chemical Society



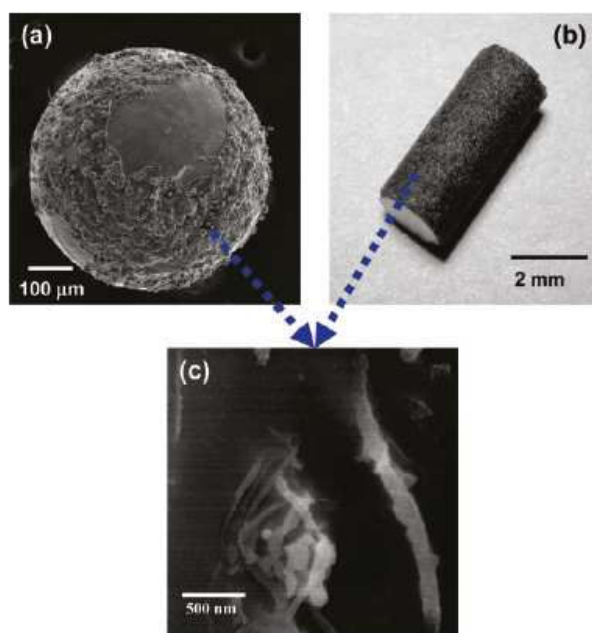


Figure 1. HA/4 wt % CNT-coated implants: (a) spherical Ti bead, (b) titanium rod, and (c) top surface of plasma-sprayed HA–CNT coating showing embedded CNTs in HA matrix. Coatings on Ti spherical bead rods were deposited using spray-dried HA and HA/4 wt % CNT powder as starting material. Plasma spraying was performed using SG 100 gun (Praxair Surface Technology, Danbury, CT) at 23 kW power. A JEOL JSM 630F scanning electron microscope (SEM) with a field emission gun was used to obtain pictures in (a) and (c). The picture of coated Ti rod was captured using a Sony DSC 400 digital camera.

are required for critical and synergistic evaluation prior to clinical translation.

## RESULTS

Titanium beads or rods were implanted inside the distal part of an external condyle of the femoral bone of rodents (Figure 2a) during one month. Titanium beads and rods had three different types of coatings: (i) uncoated titanium, (ii) HA coating, and (iii) HA/4 wt % CNT coating. The coating thickness was 100–150  $\mu\text{m}$ . Three groups of titanium implants were tested in the pull-out model for mice and rats: uncoated (group 1), HA coating (group 2), HA/4 wt % CNT composite coating (group 3). As a group control, a hole was made inside the femoral bone with no implant (group 4).

**Clinical Results.** Table 1 lists all groups including the control group. A total of 23 animals were used for this study. Each animal received only one type of implant in order to avoid systemic responses. Clinical results showed that none of the animals died during surgery or postoperatively. Rats and mice could walk without any disabilities after the implantation surgery. No infection, no disunion of the scar, and a complete range of motions of the knee joint were observed. After dissection and retrieval of all parts of the femoral bone with knee joint, no infected tissues were found (Figure 2b). X-ray images of rat femoral bones after one month of implantation from all four groups are shown in Figure 3. The implants from groups 1 (bare titanium), 2 (HA coating on titanium), and 3 (HA–CNT coating on

titanium) were well-positioned inside the external femoral condyle. None of the implant was ejected. Cortical bones were restored completely, and a good healing was achieved for all four group bones after one month of implantation. We also observed good osseointegration (no osteolysis around implants) or no specific periosteal reactions (sign of infection) around the three groups of implants in the rats and mice.

**Histological Results.** Semithin (1–2 mm) sections were cut from rat's femoral bone with the embedded implant for the microscopic observations (Figure 4a). The spherical beads in mice bones were completely removed before cutting the bone. Periosteal tissue was restored for all groups, without any inflammatory reactions at the perforation location of the cortical bone. Cortical and marrow bones appeared normal around each implant (groups 1, 2, and 3) without any specific abnormal tissues. No osteolysis was observed at the periphery of the rod-shaped implants embedded inside the external femoral condyle. This also included HA–CNT composite implants (group 3), which is of greater interest for this study. For histological observations, all implants from mice and rats were fully removed from the bone using forceps. It was most difficult to detach group 3 implants (HA–CNT-coated beads and rods) as compared to groups 1 and 2, which is a qualitative indicator of the strong adherence of CNT containing HA coating with the bone.

The bone around implants of groups 1, 2, and 3 was compared with the control bones (group 4) for both

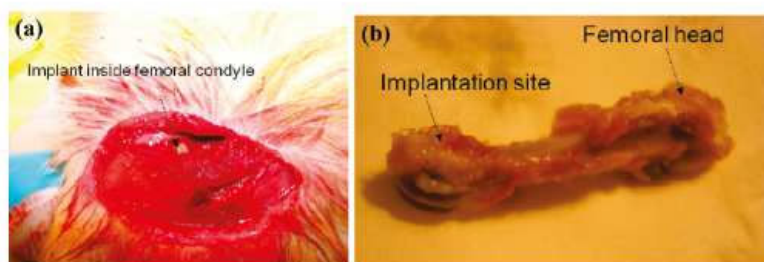


Figure 2. (a) Through a bony defect, a rod is completely introduced inside the distal rat femoral bone. (b) Rat femoral bone retrieved from group 3: HA–CNT-coated titanium implant at the distal part was recovered by periosteum. One month after implantation, mice and rats were killed with an overdose of ketamine and xylazine. For different *ex vivo* analysis, all parts of the femoral bone, from femoral head to knee joint, were excised on mice and rats and cleaned of the soft tissue. No infected or inflammatory tissues were found in groups 1, 2, 3, and 4.

**TABLE 1.** List of Different Types of Surgeries and Implantations on Rodents: Uncoated Titanium Implant (Group 1), HA Coating on Titanium Implant (Group 2), HA/4 wt % Coating on Titanium Implant (Group 3), and a Group Control with No Implant Just a Hole Performed (Group 4)<sup>a</sup>

	mice	rats
group 1 (uncoated titanium)	6 beads	2 rods
group 2 (HA coating)	4 beads	2 rods
group 3 (HA/4 wt % CNT coating)	7 beads	2 rods
group 4 (no implant)	4 holes	2 holes

<sup>a</sup>Holes were made in the same animal on the left femoral bone to minimize the number of sacrificial animals. Hence, a total of 17 mice and 6 rats were used for *in vivo* studies.

mice and rats. The approach was to compare *ex vivo* tissues, cell behavior, and bioactivity around implants using SEM, TEM observations, and different histological methods. Figure 4 shows the histological observations from groups 1, 2, and 3 implants embedded in mice. Bone tissues exhibited new grown bone, hematopoietic marrow, and trabecular bones, which were synthesized with osteocytes into their lacuna. Similar results were observed for the rod-shaped implants embedded in rats' bones as shown in Figure 6. After one month of surgery, the medullar cavity in group 4 was fully restored. The cortical defect for all groups was also restored due to formation of the neocortical bone. Figure 5 also shows a gray layer attached on the bone closed to the cavity (C). The layer is thicker for HA–CNT-coated implants (group 3) as compared to HA-coated (group 2) and uncoated implants (group 1). With toluidine blue coloration in Figure 7, it is clearly observed that HA–CNT coating (gray layer) was strongly attached to the newly grown bone tissues. This explains the difficulty in detaching the group 3 implants from the bone using forceps. A normal neobone near the HA–CNT coating suggests that bone regeneration was complete.

**TEM Results.** Transmission electron microscopy (TEM) was employed to study the bone in retrieved implants from mice and rats for all groups. Since HA–CNT coating

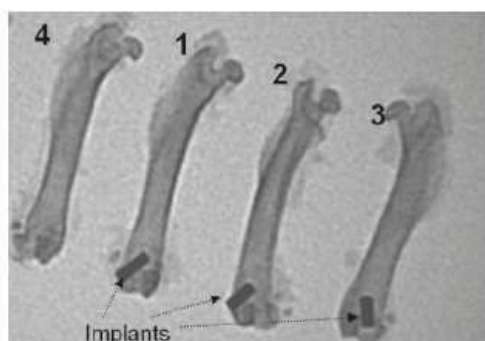


Figure 3. X-ray images of rat femoral bones after one month implantation. The distal part contains (1) uncoated titanium implant, (2) HA coating on titanium implant, (3) HA–CNT composite coating on titanium implant, and (4) no implant after the perforation of bone. The three different implants were well-positioned inside external condyle, and none of the implant was ejected. A good healing was achieved for all four bones. We observed good osseointegration (no osteolysis around implants) or no periosteal reactions (sign of infection) around three bones containing implants.

is the focus of this study, TEM results from only group 3 are presented here. Other groups also displayed very similar microstructural observations from the bone (see Supporting Information, Figures S1 for TEM results from groups 1, 2, and 4). Figure 8a shows TEM images of the mice bone. Osteocytes into their lacuna with the bone matrix, osteoclasts, and osteoblasts were present. Both trabecular bone and bone marrow have been normally restored without inflammatory response. The cells inside vessels or adipocytes were also normal. No CNT was observed inside the macrophages' cytoplasm. Figure 8b shows TEM images of the rats' bones. Normal bone cells and bony trabeculum were observed without necrosis or inflammatory reaction. There was no tissue degeneration or neutrophil infiltration for HA–CNT-coated implants. CNT migration was not observed in either newly formed bone adjacent to the coating or distant bone.

**Elastic Properties of the Bone/Implant Interface.** Figure 4b shows the locations across the implant/bone interface,



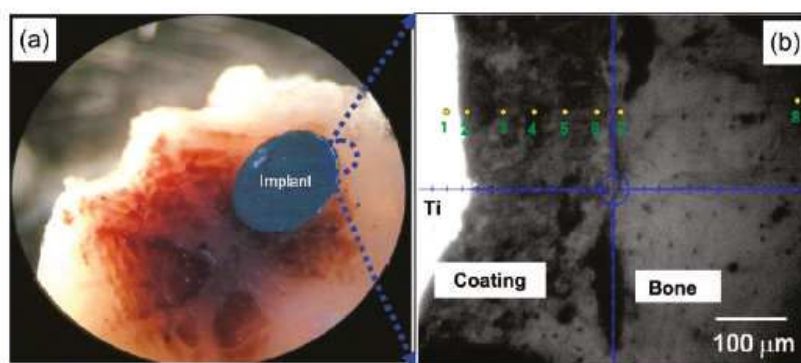


Figure 4. (a) *Ex vivo* semithin (1–2 mm) sections were cut from the rat's bone with implant embedded inside. Microscopic observations were performed at  $5\times$ . Titanium rods were fixed inside the external femoral condyle. Normal cortical bone and bone marrow were observed around the implant (group 1, 2, and 3), without any specific inflammation tissues or osteolysis. (b) Optical cross-sectional micrograph of the retrieved implant from rat showing Ti substrate, HA/HA–CNT coating, and bone. This micrograph is representative of groups 2 and 3 samples showing the locations of modulus mapping measurements by Arabic numbers. Position 1 denotes the region in the titanium part of the implant near the coating. Positions 2–6 are equally placed locations through the thickness of HA/HA–CNT coating starting from the titanium side and going toward the bone. Position 7 is in the newly grown bone along the implant surface, and position 8 is in a distant region that represents the normal bone.

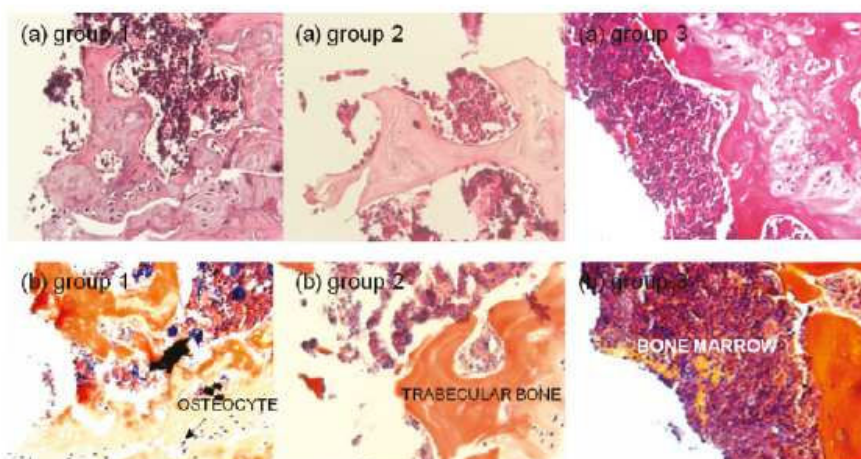


Figure 5. Histological results ( $40\times$ ) for mice bones which were implanted with spherical beads. (a) Mallory coloration images and (b) hematoxylin-eosine coloration images for groups 1, 2, and 3. These images show normal, thick trabecular, and hematopoietic marrow bones without any inflammatory reactions.

where modulus mapping experiments were performed on groups 2 and 3. The measurements include one region in the Ti rod near the coating, five equally spaced regions across the coating, one region in the newly generated bone near the coating, and one region far from the implant that represents the natural bone. In the case of the bare Ti implant (group 1), measurements were made in three regions *viz.* in Ti substrate, newly generated bone near Ti, and the natural bone at a distance from the implant. Modulus mapping of cross section of the bone, without any implant (group 4), was also carried out as the control sample. At least three areas of  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  were used for 2D modulus mapping from each region to obtain the representative value of the elastic modulus.

Elastic modulus of the implant/coating/bone interface is evaluated considering its significance with respect

to the failure of an implant *in vivo*. Dissimilar elongation or strain in the adjacent parts at the bone/implant interface could cause localized stress generation, followed by fracture and delamination of the implant from the bone. Figure 8 is a compilation of the modulus maps for groups 1–4 implants. The color scale for the elastic modulus has been kept constant between 0 and 250 GPa for all images. It enables a clear visualization of the change in elastic modulus across the implant/coating and coating/bone interfaces. Elastic modulus for titanium was similar throughout for groups 1, 2, and 3, which indicates no change in Ti properties after *in vivo* exposure of one month, but both HA and HA–CNT coatings show changes in the elastic modulus in the retrieved implant. Elastic modulus of the coatings in groups 2 and 3 is highest near Ti and reduces gradually toward the bone, as observed from

214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230



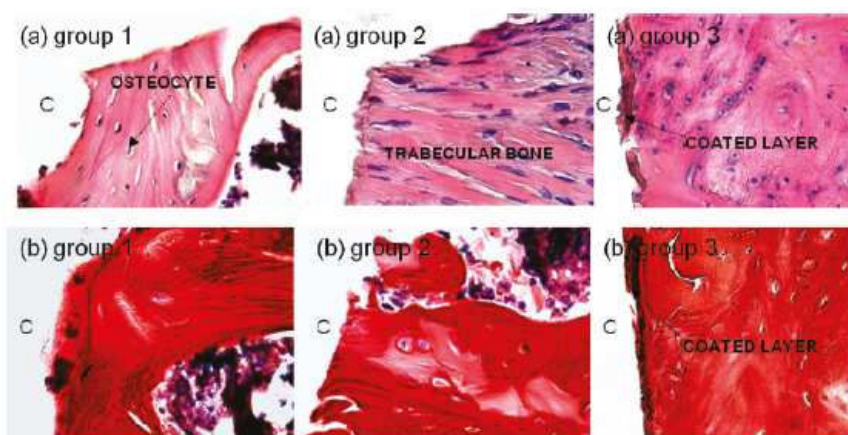


Figure 6. Histological results (40 $\times$ ) for rat bones with rod-shaped implants. (a) Mallory coloration images and (b) hematoxylin-eosine coloration images for groups 1, 2, and 3. These images show normal, thick trabecular, and hematopoietic marrow bones, without any inflammatory reactions and tissues. A layer is observed attached on the bone closed to the cavity (C) caused by the retrieved implant. The layer is thicker for group 3 (HA–CNT coating) and attached to newly grown bone tissues.



Figure 7. Histological image (5 $\times$ ) of group 3 implant in rat, with toluidine blue coloration showing HA–CNT coating strongly attached to newly grown bone tissues. Normal neobone closed to the coating with normal cell morphology was found.

the gradual change in the color of modulus maps in Figure 9. Figure 10 presents the change in an average modulus value across the distance over the implant–bone interfaces for groups 1–3 implants (see Supporting Information for methodology to obtain average elastic modulus from modulus maps). Bare Ti-implanted bone shows a very sharp change in elastic modulus across the bone–implant interface, which possess the risk of loosening of implant, fracture of bone, and delamination from the implant surface due to highest strain gradient.<sup>32</sup> Presence of HA–CNT and HA coatings creates a smooth gradient of elastic modulus across the implant–bone interface, which increases the mechanical compatibility of the implant with the bone and reduces the chance of fracture or implant failure. Thus, in addition to bone integration, HA-based coatings also play a vital role in maintaining the mechanical health of the implanted bone.

## DISCUSSION

Clinical, histological, and TEM observations described above indicate that CNT addition promotes the formation of the new bone without any detrimental effect. Our clinical and X-ray results were the same for both rodents, with no side effects, no osteolysis, and a good osseointegration for the CNT–HA composite implants. Biocompatibility with the bone near the implant and in a distant bone was excellent. Haematopoietic marrow and trabecula bones appeared with a good integrity; all different types of cells associated with bone suggested a normal neobone induction. The presence of osteocytes in the lacuna and the observation of bony trabeculum and osteoblasts were specific for bone formation. Bioactivity and morphology of cells around all implants were completely normal. HA–CNT did not induce necrosis or inflammatory reactions<sup>24</sup> or formation of tissue granulomas.<sup>18</sup> Our promising

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

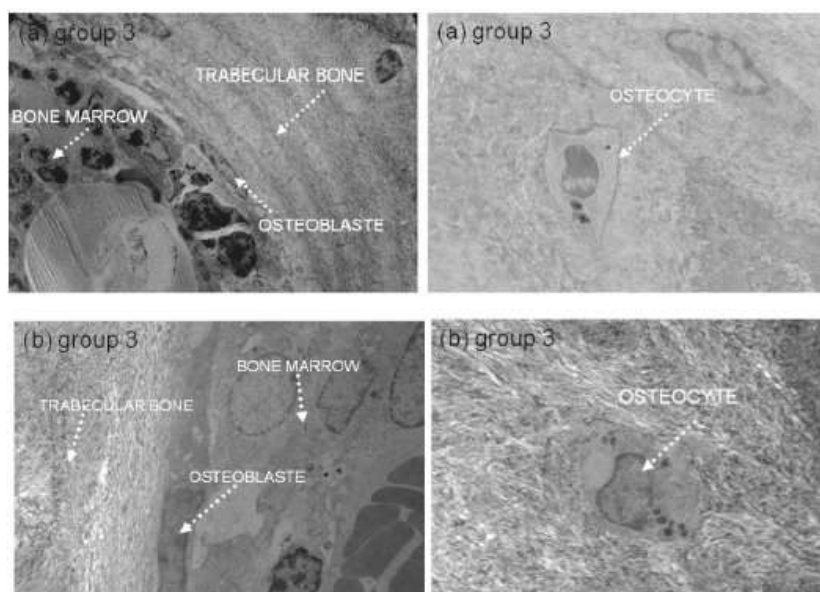
263

264

265

266





**Figure 8.** TEM observations of HA–CNT-coated titanium implants at 2200× magnification. Images (a) are from mice bone, whereas images (b) are from rats' bones. No abnormal cells and no CNTs were observed inside any phagocytes. In both rodents, cortical and marrow bones were perfectly restored. Osteoblast and osteocyte morphologies were normal.

results are largely attributed to the presence of CNTs that accelerate bone growth,<sup>24</sup> biomineralization, and inhibit osteoclastic bone resorption.<sup>29</sup> The accelerated bone repair occurs because CNTs stimulate osteoblast proliferation and adhesion.<sup>33</sup> CNTs can also form an efficient nanomatrix for the growth of HA crystals with a stoichiometric value that complies with natural HA.<sup>25,26,34,35</sup> Hence, CNTs act as an effective nucleation surface to induce the formation of a biomimetic apatite coating. A better adhesion was observed for HA–CNT-coated implants (group 3) which could be attributed to the nucleation of apatite on the CNT surface that promotes anchorage.<sup>9,24,25</sup> The higher surface area of CNTs also promotes bonding, as observed in Figure 7, where HA–CNT coating was bonded with newly grown bone. For orthopedic surgeons, osseointegration of joint replacement continues to be a challenge in terms of quality and duration, which could be improved by CNT addition to HA.

One of the controversial issues is the toxicity of CNTs on tissues<sup>16</sup> and cells.<sup>36,37</sup> Nanotoxicological potential on human macrophage cells<sup>38,39</sup> and phagocytes<sup>30</sup> could increase inflammation and decrease wound healing for orthopedic implants. It has been reported that for human macrophage cells exposed to an unpurified multiwalled carbon nanotube, a decrease in the activity was correlated with uptake of CNT due to necrosis.<sup>38</sup> Unpurified CNTs have been observed by transmission electronic microscopy into the cytoplasm and the nucleus. CNTs were able to enter the cell through the phenomena of endocytosis. CNTs may also cause incomplete phagocytosis *in vivo*<sup>30</sup> and may result in an oxidative stress and cell death *in vitro*.<sup>38</sup>

The phenomena of phagocytosis or necrosis or any strong inflammation reactions were not observed in our study near the implant/coating/bone interface in group 3 samples with HA–CNT coating. The same observations were made for new and distant bone cells. The lack of inflammatory response is because enzymatic biodegradation of nanotubes does not induce any inflammatory response.<sup>18</sup> Inflammation could also be explained by the ineffective internalization of nonfunctionalized nanotubes by phagocytic cells.<sup>40</sup> Nanotubes are actively ingested through phagocytosis in macrophages in significant quantities without cytotoxic effects.<sup>41</sup> It has also been shown that wear debris generated from plasma-sprayed HA–CNT coating does not alter the cytotoxicity response of macrophages.<sup>10</sup> Some studies even suggested that macrophages induced by nanotubes may mediate bone formation because macrophages can produce osteoinductive factors (TGF- $\beta$ , BMP-2).<sup>27</sup>

Another novel feature of this study is the elastic modulus measurement of the new bone and its comparison with the Ti implant, HA, and HA–CNT coatings and distant bone. Such study enables an indirect prediction of the stress and strains at the implant/bone interface which is critical for the mechanical integrity of the implant. Elastic modulus of Ti, HA coating, and HA–CNT coating before implanting was measured to be  $109 \pm 3$ ,  $90 \pm 10$ , and  $115 \pm 9$  GPa, respectively. These coatings were soaked in formalin for 18 days, and elastic modulus was measured again in the soaked condition to evaluate if there is any effect of formalin soaking on the modulus of coatings. However, the elastic modulus values of the coatings remain similar before and after formalin soaking, indicating the change

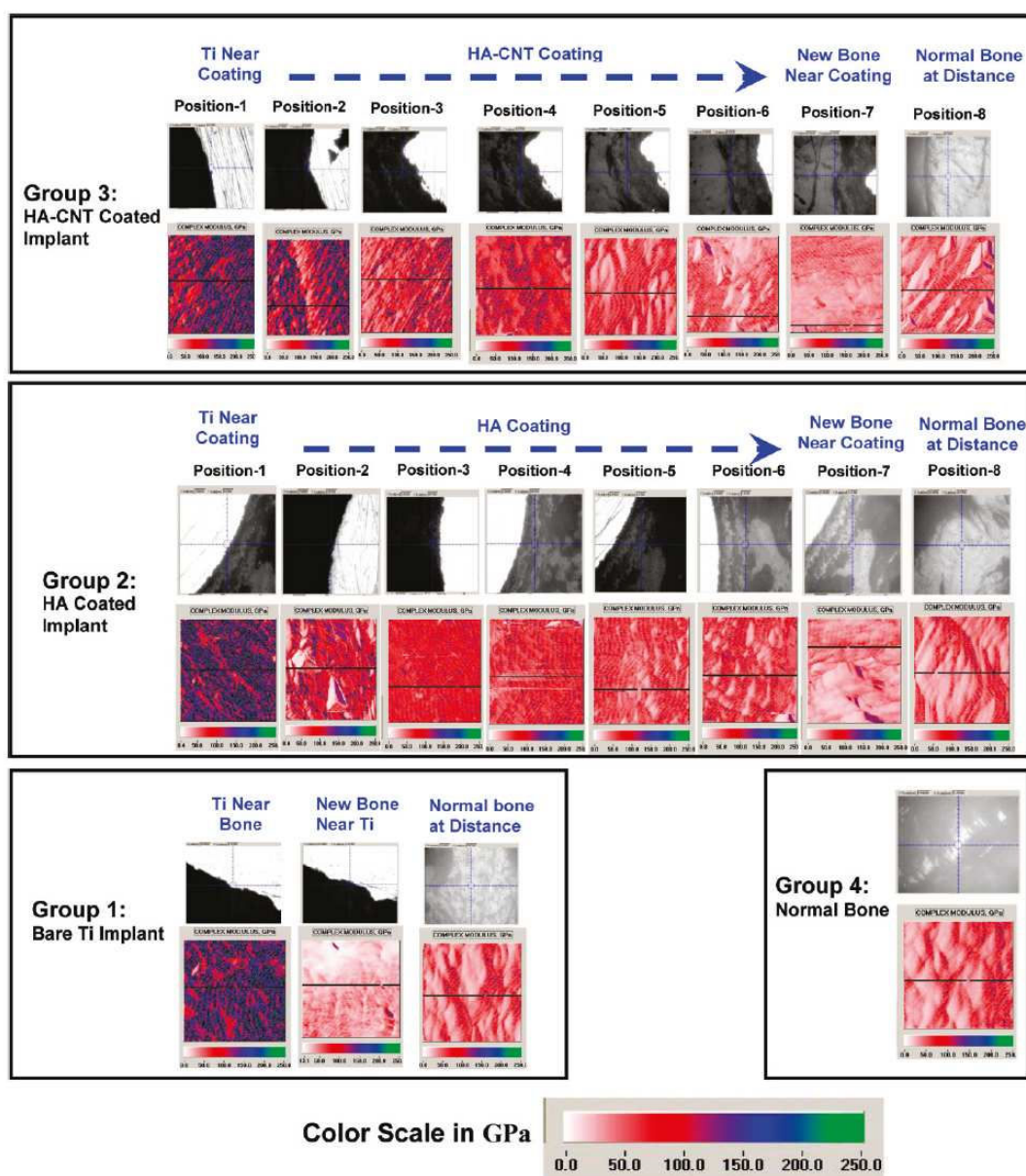


Figure 9. Modulus map from different regions in rat implant/coating/bone interfaces for groups 1–4. Positions of maps in groups 2 and 3 are as shown in Figure 2b. The color scale for modulus maps is similar and varies between 0 and 250 GPa. Titanium in groups 1, 2, and 3 implants shows a high elastic modulus with a dark blue color in the map. Elastic modulus of the coatings (groups 2 and 3) reduces gradually through thickness from near Ti to the bone. The new bone shows the lowest modulus for all groups. Similar modulus for normal bones in all four groups indicates no effect of implant material on the mechanical performance of the normal bone. Group 1 shows a sharp change in the modulus (color) at the implant/bone interface. The change in modulus at the implant/bone interface for groups 2 and 3 is more gradual.

in retrieved implants is due to the *in vivo* exposure only and not due to their preservation in formalin.

Figures 9 and 10 show a decreasing gradient in the elastic modulus of both HA and HA–CNT coatings, which is attributed to the tissue in-growth at the coating/bone interface during new bone formation. During the bone formation process, osteoblasts initially play an active role in the collagen matrix formation on the implant surface. HA-based coatings have porosity in its plasma-sprayed microstructure also due to

possible resorption. Due to the porous nature of the coatings, the collagen fibers get impregnated in the coatings,<sup>42</sup> making the integration of bone more effective and at the same time modifying the modulus of the coating. Presence of HA in the coating, which possesses similar chemistry of the mineral content of bone, further helps in bone formation and integration on the coated implant surface.

Figure 10 also shows the effect of CNT addition on the elastic modulus of HA coating. Elastic modulus of



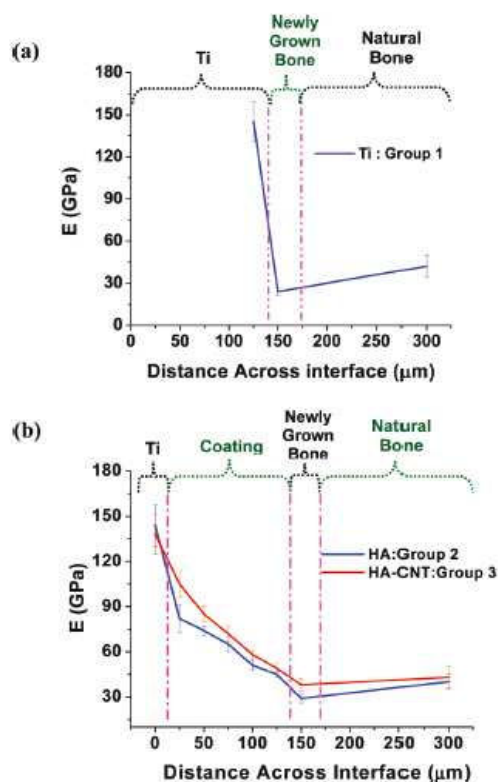


Figure 10. Gradient of elastic modulus across rat bone/implant interface for (a) group 1, Ti implant; (b) group 2, HA-coated Ti implant; and group 3, HA–CNT-coated Ti implant. Elastic modulus values were averaged from the modulus maps presented in Figure 8. Group 1 samples show a sharp change in the elastic modulus at the Ti/bone interface, which pose a risk of fracture or delamination. In groups 2 and 3, the elastic modulus changes gradually through the coating thickness and makes a smoother profile of the modulus at the implant/bone interface with a reduced chance of the failure. The modulus for the Ti part of the implant and normal bone at a distance from the implant remains the same for both groups 2 and 3. CNT reinforcement in HA shows an improvement in the elastic modulus of the HA coating and also the adjacent new bone formed.

the coating remains higher throughout for HA–CNT than for HA, which is clearly due to the reinforcing effect of CNT even after *in vivo* exposure. The newly grown bone near the implant surface shows the lowest modulus in the case of a bare Ti implant (group 1). Presence of HA on the implant surface helps better mineralization of the bone and as a result a higher modulus than the bone near a bare Ti surface. Further, elastic modulus of the bone near the HA–CNT surface shows higher value than the bone at the HA surface. This observation could be explained by the favorable

role of CNT in osteoblast proliferation and differentiation reported until now.<sup>9,25</sup> It was found that osteoblasts show better proliferation and viability in the presence of CNTs in the culture surface. Preferential absorption of favorable proteins on the CNT surface is found to be responsible for such behavior.<sup>43</sup> Implanting raw CNTs in a mouse skull is also found to accelerate *in vivo* bone growth.<sup>24</sup> In addition, the presence of CNT is reported to inhibit the osteoclast proliferation, which destroys the bone structure.<sup>29</sup> Thus, the presence of CNT also fights out the negative factor of bone growth. As a result, the bone growth near the HA–CNT interface becomes more active, causing higher elastic modulus than the bone near the HA interface, which is a very impressive and attractive finding to be reported for the first time. Elastic modulus for the normal bone in all of the cases, including the bone that was not implanted, shows similar value, indicating no adverse effect of CNT addition on the mechanical health of the bone.

## CONCLUSIONS

The major findings of this *in vivo* study suggest that CNTs can be used as nanoreinforcement for the HA composite for orthopedic applications without any negative effect. CNT addition resulted in the growth of new bone and improved osseointegration as observed from the adhesion of HA–CNT coating (group 3). The elastic modulus of the newly grown bone was comparable with the distant bone, suggesting excellent mechanical integrity of the implant. Since it has already been proved in our previous work that plasma-sprayed HA–CNT coatings exhibit improved fracture toughness and wear resistance,<sup>9,10</sup> this *in vivo* study using an animal model bolsters the role of HA–CNT coating for orthopedic implants. It is suggested that longer implantation (one year) is needed to further appreciate the quality of osseointegration and to evaluate safety of HA–CNT coating prior to clinical application. Functionalization of exposed CNTs (Figure 1c) in the HA–CNT composite coating by drugs<sup>23</sup> before implantation could be performed by immersion of coated prostheses in a solution of bone growth factors such as Rh-BMP2 to avoid loosening or treated with antibiotics such as Gentamicine to avoid infection. Hence, this study has potentially far reaching benefits for orthopedic applications. Healing time and osseointegration of biomedical materials for joint replacements could be improved with a HA–CNT composite coating.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials and Processing.** The methodology of this study was to implant titanium with and without coatings inside the bone of

rodents (mice and rats) and to compare tissue, cell behavior, and bone–interface around the implants using histological and TEM observations. Two geometries of Ti-6Al-4V alloy with and



without coatings were implanted: spherical beads for mice and rods for rats. The spherical beads were 1 mm in diameter, whereas rods were 10 mm long and 2.5 mm in diameter (Figure 1a,b). Spherical titanium beads and rods were coated by a plasma spraying process in the Plasma Forming Laboratory at Florida International University, Miami, USA. Plasma spraying technique is an FDA-approved process and the most frequently used for depositing HA coatings on orthopedic implants.<sup>1</sup> HA nanorods (length = 100–325 nm, diameter = 25–50 nm, density = 3.2 g·cm<sup>-3</sup>) and multiwalled carbon nanotubes (95% purity, 25–50 nm o.d., length = 0.5–2 μm, density = 2.1 g·cm<sup>-3</sup>) were spray dried together to form an agglomerate which served as the feedstock for plasma spraying.<sup>10</sup> Density of HA and HA–CNT coatings, measured using Archimedes principle and water as immersion medium, is 93.7 and 94.0% TD, respectively. X-ray diffraction patterns from both coatings show HA as the major phase. A small amount of β-TCP phase was also observed which is due to partial dissociation of HA during plasma spraying (Figure S2 in Supporting Information). HA–CNT coating evinced higher fracture toughness of 3 MPa·m<sup>1/2</sup> as compared to 0.64 MPa·m<sup>1/2</sup> for HA due to CNT bridging (Figure S3 in Supporting Information).

**Surgery.** For all *in vivo* studies, animals were acclimated for a minimum of two weeks prior to the experimentation. All procedures were performed with prior received ethical approval and carried out in accordance with the regulations laid down for the animals. The samples were implanted: on male mice (46–54 g, 12 weeks old), a total of 17 ICR (Imprinting Control Region) mice from C. River (Wilmington, MA) were operated; and then on male rats (520–630 g, 17 weeks old), a total of 6 Wistar rats from C. River were operated. The mice and rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The surgical procedure involved removal of the hair over the external part of right lower limb via shaving and cleaning. The animals were placed on ventral decubitus, with external rotation and abduction of the lower limb. With strict aseptic conditions, after skin incision, patella and quadriceps tendons were released. A circular bone defect on external femoral condyle, 1 mm diameter for mice and 3 mm for rats, was performed using an electrical drill with a sterile round bur under irrigation of sterile normal saline. Through the bony defect, beads for mice and rods for rats were completely introduced inside the distal femoral bone. Patella and quadriceps tendons were replaced without sutures, and the skin was closed with nonabsorbable sutures. All animals were examined on a weekly basis for any sign of infection or discomfort on the lower limb for a period of one month. All of the implants were retrieved after one month.

**Histology.** For histological observations, the bones with the implants were sectioned to a thickness of 1–2 mm, with a low speed diamond saw. Then the samples were fixed in neutral formalin solution of 20%, then decalcified inside acetic acid solution of 10% for 4 days and embedded in paraffin. Ultrathin sections were cut at 70 nm, but then bars on the rats' bones were removed before. Sections were stained with Mallory and hematoxylin-eosin colorations and histologically analyzed by light microscopy. For histological observations of rats' bones, some ultrathin sections were also stained with toluidine blue coloration and histologically analyzed by light microscopy.

**Transmission Electron Microscopy.** For TEM, samples were fixed in 4% buffered paraformaldehyde solution, decalcified inside acetic acid solution of 10% during 4 days, postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at 4 °C, dehydrated through graded alcohol, and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut at 70 μm with a diamond knife and stained with uranyl acetate and lead nitrate and observed with a Morgagni 268 electron microscope.

**Nanoindentation.** Hysitron Triboindenter TI 900 was used to evaluate elastic modulus (E) of the newly grown bone and HA-based coatings in the retrieved implants evaluated using nanoindentation. The cross sections of the retrieved implant bone (Figure 4a) were cleaned by removing the attached tissues. The elastic modulus across the implant/coating/bone interfaces was determined using "modulus mapping" in nano-dynamic analysis (nanoDMA) mode. The tests were carried out

on the samples hydrated in formalin.<sup>44</sup> Two-dimensional maps of elastic modulus of the sample surface were produced. In order to prepare the sample surface for nanoindentation experiments, implant cross sections were polished using a wet cloth without any abrasive particles. Abrasive particles were not used to restrict the impregnation of the bone surface with the harder particles, which could influence the mechanical properties. A Berkovich indentation probe of 100 nm radius was used for the measurements. The static and dynamic loads for the measurements were 3 and 1.5 μN, respectively, with an applied frequency of 200 Hz. Each 2D modulus map presented in this study covers a 5 μm × 5 μm area on the sample surface that includes a matrix of equally spaced 256 × 256 points, resulting in 65 536 measurements in each scanning. During the measurement of elastic modulus (E), the bone samples were kept hydrated by adding formalin using a dropper to carry out the tests in wet conditions.

**Acknowledgment.** 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). D.L. acknowledges the support from the Dissertation Year Fellowship by University Graduate School, Florida International University. *In vivo* work was supported by the "Alsace contre le Cancer". F.F. thanks the Faculté de Chirurgie Dentaire 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).

**Supporting Information Available:** TEM observation of retrieved groups 1, 2, and 4 implants, methodology to obtain average elastic modulus from modulus maps, X-ray diffraction patterns of plasma-sprayed HA and HA–CNT coatings, and explanations and picture of the effect of CNT reinforcement on HA. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES AND NOTES

- Campbell, A. A. Bioceramics for Implant Coatings. *Mater. Today* **2003**, *6*, 26–30.
- Poitout, D. G., Ed. *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics*; Springer: London, 2004; ISBN: 1852334819.
- Wang, J.; Shaw, L. L. Nanocrystalline Hydroxyapatite with Simultaneous Enhancements in Hardness and Toughness. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6565–6572.
- Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
- Hwang, G. L.; Hwang, K. C. Breakage, Fusion, and Healing of Carbon Nanotubes. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 435–438.
- Troiani, H. E.; Miki-Yoshida, M.; Camacho-Bragado, G. A.; Marques, M. A. L.; Rubio, A.; Ascencio, J. A.; Jose-Yacaman, M. Direct Observations of the Mechanical Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes and Their Junctions at Atomic Level. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 751–755.
- Muthaswami, L.; Zheng, Y.; Vajtai, R.; Shehkwat, G.; Ajayan, P.; Geer, R. E. Variation of Radial Elasticity in Multiwalled Carbon Nanotubes. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3891–3894.
- Yu, M. F.; Lourie, O.; Dyer, M. J.; Moloni, K.; Kelly, T. F.; Rouff, R. S. Strength and Breaking Mechanism of Multiwalled Carbon Nanotubes under Tensile Load. *Science* **2000**, *287*, 637–640.
- Balani, K.; Anderson, R.; Laha, T.; Andara, M.; Tercero, J.; Crumpler, E.; Agarwal, A. Plasma-Sprayed Carbon Nanotube Reinforced Hydroxyapatite Coatings and Their Interaction with Human Osteoblasts *In Vitro*. *Biomaterials* **2007**, *28*, 618–624.
- Lahiri, D.; Benaduce, A. P.; Rouzaud, F.; Solomon, J.; Keshri, A. K.; Kos, L.; Agarwal, A. Wear Behavior and *In Vitro* Cytotoxicity of Wear Debris Generated from Hydroxyapatite–Carbon Nanotube Composite Coating. *J. Biomed. Mater. A* **2011**, *96*, 1–12.
- Balani, K.; Chen, Y.; Harimkar, S. P.; Dahotre, N. B.; Agarwal, A. Tribological Behavior of Plasma-Sprayed Carbon Nanotube-Reinforced Hydroxyapatite Coating in Physiological Solution. *Acta Biomater.* **2007**, *3*, 944–951.



12. Lahiri, D.; Singh, V.; Keshri, A. K.; Seal, S.; Agarwal, A. Carbon Nanotube Toughened Hydroxyapatite by Spark Plasma Sintering: Microstructural Evolution and Multiscale Tribological Properties. *Carbon* **2010**, *48*, 3103–3114.
13. Wang, X.; Padture, N. P.; Tanaka, H. Contact-Damage-Resistant Ceramic/Single-Wall Carbon Nanotubes and Ceramic/Graphite Composites. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 539–544.
14. Zhan, G. D.; Kuntz, J. D.; Wan, J.; Mukherjee, A. K. Single-Wall Carbon Nanotubes as Attractive Toughening Agents in Alumina-Based Nanocomposites. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 38–42.
15. Balani, K.; Agarwal, A. Wetting of Carbon Nanotubes by Aluminium Oxide. *J. Nanotechnol.* **2008**, *19*, 165701–165708.
16. Fioritto, S. *Carbon Nanotubes. Angels or Demons?*, 1st ed.; Pan Stanford Publications: Singapore, 2008; pp 105–133.
17. Cheng, C.; Muller, K. H.; Koziol, K. K. K.; Skepper, J. N.; Midgley, P. A.; Welland, M. E.; Porter, A. E. Toxicity and Imaging of Multi-walled Carbon Nanotubes in Human Macrophage Cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, 4152–4160.
18. Kagan, V. E.; Konduru, N. V.; Feng, W.; Allen, B. L.; Conroy, J.; Volkov, Y.; Vlasova, I. I.; Belikova, N. A.; Yanamala, N.; Kapralov, A.; et al. Carbon Nanotubes Degraded by Neutrophil Myeloperoxidase Induce Less Pulmonary Inflammation. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 354–359.
19. Singh, R.; Pantarotto, D.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Klumpp, C.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. Tissue Biodistribution and Blood Clearance Rates of Intravenously Administered Carbon Nanotube Radiotracers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 3357–3362.
20. Kostarelos, K. Carbon Nanotubes Fibrillar Pharmacology. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 793–795.
21. Kolosnjaj-Tabi, J.; Hartman, K. B.; Boudjemaa, S.; Ananta, J. S.; Morgant, G.; Szwarc, H.; Wilson, L. J.; Moussa, F. *In Vivo* Behavior of Large Doses of Ultrashort and Full-Length Single-Walled Carbon Nanotubes after Oral and Intraperitoneal Administration to Swiss Mice. *ACS Nano* **2010**, *4*, 1481–1492.
22. Ren, H. X.; Chen, X.; Liu, J. H.; Gu, N.; Huang, X. J. Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotube: How We Were Wrong? *Mater Today* **2010**, *13*, 6–8.
23. Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M. Promises, Facts and Challenges for Carbon Nanotubes in Imaging and Therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 627–633.
24. Usui, Y.; Aoki, K.; Narita, N.; Murakami, N.; Nakamura, I.; Nakamura, K.; Ishigaki, N.; Yamazaki, H.; Horiuchi, H.; Kato, H.; et al. Carbon Nanotubes with High Bone-Tissue Compatibility and Bone-Formation Acceleration Effects. *Small* **2008**, *4*, 240–244.
25. Zanello, L. P.; Zhao, B.; Hu, H.; Haddon, R. C. Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes. *Nano Lett.* **2006**, *3*, 562–567.
26. Niu, L.; Kua, H.; Chua, D. H. C. Bonelike Apatite Formation Utilizing Carbon Nanotubes as Template. *Langmuir* **2010**, *26*, 4069–4073.
27. Kasai, T.; Matsumura, S.; Iizuka, T.; Shiba, K.; Kanamori, T.; Yadasaka, M.; Iijima, S.; Yokoyama, A. Carbon Nanohorns Accelerate Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defect. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 065102.
28. Hahn, B. D.; Lee, J. M.; Park, D. S.; Choi, J. J.; Ryu, J.; Yoon, W. H.; Lee, B. K.; Shin, D. S.; Kim, H. E. Mechanical and *In Vitro* Biological Performances of Hydroxyapatite–Carbon Nanotube Composite Coatings Deposited on Ti by Aerosol Deposition. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 3205–3214.
29. Narita, N.; Kobayashi, Y.; Nakamura, H.; Maeda, K.; Ishihara, A.; Mizoguchi, T.; Usui, Y.; Aoki, K.; Simizu, M.; Kato, H.; et al. Multiwalled Carbon Nanotubes Specifically Inhibit Osteoclast Differentiation and Function. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1406–1413.
30. Sakaguchi, N.; Watari, F.; Yokoyama, A.; Nodasaka, Y. High-Resolution Electron Microscopy of Multi-wall Carbon Nanotubes in the Subcutaneous Tissue of Rats. *J. Electron Microsc.* **2008**, *57*, 156–164.
31. Li, A.; Sun, K.; Dong, W.; Zhao, D. Mechanical Properties, Microstructure and Histocompatibility of MWCNTs/HAP Bio-composites. *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 1839–1844.
32. Mears, D. C. Metals in Medicine and Surgery. *Int. Met. Rev.* **1977**, *22*, 119–155.
33. Price, R. L.; Waid, M. C.; Haberstroh, K. M.; Webster, T. J. Selective Bone Cell Adhesion on Formulations Containing Carbon Nanofibers. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1877–1887.
34. Akasaka, T.; Watari, F.; Sato, Y.; Tohji, K. Apatite Formation on Carbon Nanotubes. *Mater. Sci. Eng., C* **2006**, *26*, 675–678.
35. Aryal, S.; Bahadur, K. C. R.; Dharmaraj, N.; Kim, K. W.; Kim, H. Y. Synthesis and Characterisation of Hydroxyapatite Using Carbon Nanotubes as a Nanomatrix. *Scripta Mater.* **2006**, *54*, 131–135.
36. Muller, J.; Huaux, F.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Moreau, N.; Delos, M.; Raymundo-Pinero, E.; Beguin, F.; Kirsch-Volders, M.; Fenoglio, I.; et al. Structural Defects Play a Major Role in the Acute Lung Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes: Toxicological Aspects. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1698–1709.
37. Lee, Y.; Geckeler, K. E. Carbon Nanotubes in the Biological Interphase: The Relevance of Noncovalence. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4076–4083.
38. Cheng, C.; Muller, K. H.; Koziol, K. K. K.; Skepper, J. N.; Midgley, P. A.; Welland, M. E.; Porter, A. E. Toxicity and Imaging of Multi-walled Carbon Nanotubes in Human Macrophage Cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, 4152–4160.
39. Kim, J. Y.; Khang, D.; Lee, J. E.; Webster, T. J. Decreased Macrophage Density on Carbon Nanotube Patterns on Polycarbonate Urethane. *J. Biomed. Mater. Res.* **2009**, *88*, 419–426.
40. Konduru, N. V.; Tyurina, Y. Y.; Feng, W.; Basova, L. V.; Belikova, N. A.; Bayir, H.; Clark, K.; Rubin, M.; Stolz, D.; Vallhov, H.; et al. Phosphatidylserine Targets Single-Walled Carbon Nanotubes to Professional Phagocytes *In Vitro* and *In Vivo*. *PLoS One* **2009**, *4*, e4398.
41. Cherukuri, P.; Bachilo, S. M.; Litovsky, S. H.; Weisman, R. B. Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15638–15639.
42. Liu, X.; Niebur, G. L. Bone Ingrowth into a Porous Coated Implant Predicted by a Mechano-Regulatory Tissue Differentiation Algorithm. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2008**, *7*, 335–344.
43. Akasaka, T.; Yokoyama, A.; Matsuoka, M.; Hashimoto, T.; Watari, F. Thin Films of Single-Walled Carbon Nanotubes Promote Human Osteoblastic Cells (Saos-2) Proliferation in Low Serum Concentrations. *Mater. Sci. Eng., C* **2010**, *30*, 391–399.
44. Pathak, S.; Swadener, J. G.; Kalidindi, S. R.; Courtland, H. W.; Jepsen, K. J.; Goldman, H. V. J. Measuring the Dynamic Mechanical Response of Hydrated Mouse Bone by Nanoindentation. *Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, *4*, 34–43.

## Supporting Information

### ***In Vivo* Osseointegration of Nano-Designed Composite Coatings on Titanium Implants**

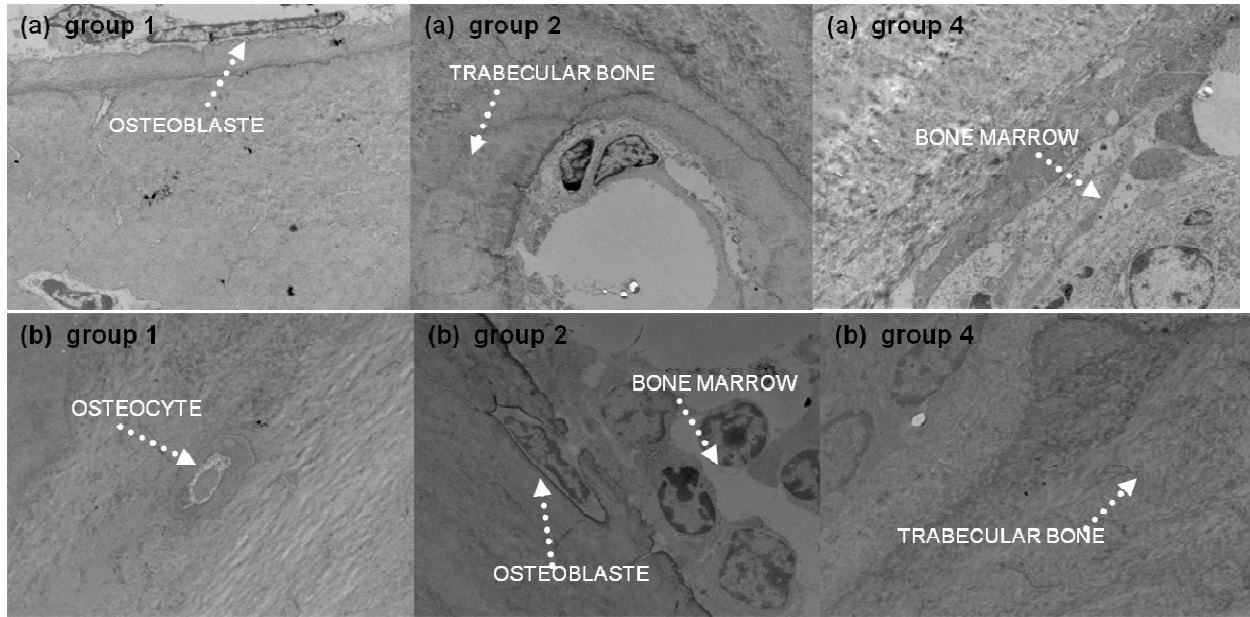


Figure S1. TEM observation of retrieved group 1, 2 and 4 implants at 2200X magnification in mouse bone (a): titanium (group 1), HA coated titanium (group 2), group control with hole without implant (group 4), and in rat bone (b): titanium (group 1), HA coated titanium (group 2), group control with hole without implant (group 4). In all samples, cortical or marrow bones and osteoblasts or osteocytes morphologies were normal.

**Methodology to Obtain Average Elastic Modulus from Modulus Maps.** During modulus mapping, the elastic modulus is measured through a matrix of 256 x 256 points, generating a total of 65536 measurements in each frame of scanning (Figure 8 in the manuscript). ASCII data file of the each modulus map gives modulus value for each of these 65536 points as an output. Three such modulus maps were obtained from each region shown in Figure 3b in the manuscript. Each data point of the curves in Figure 9 presents the average value of elastic modulus calculated using a total of (3 maps x 65536 data from each map)  $\sim 19 \times 10^4$  measurements with the standard deviation shown as error bar.

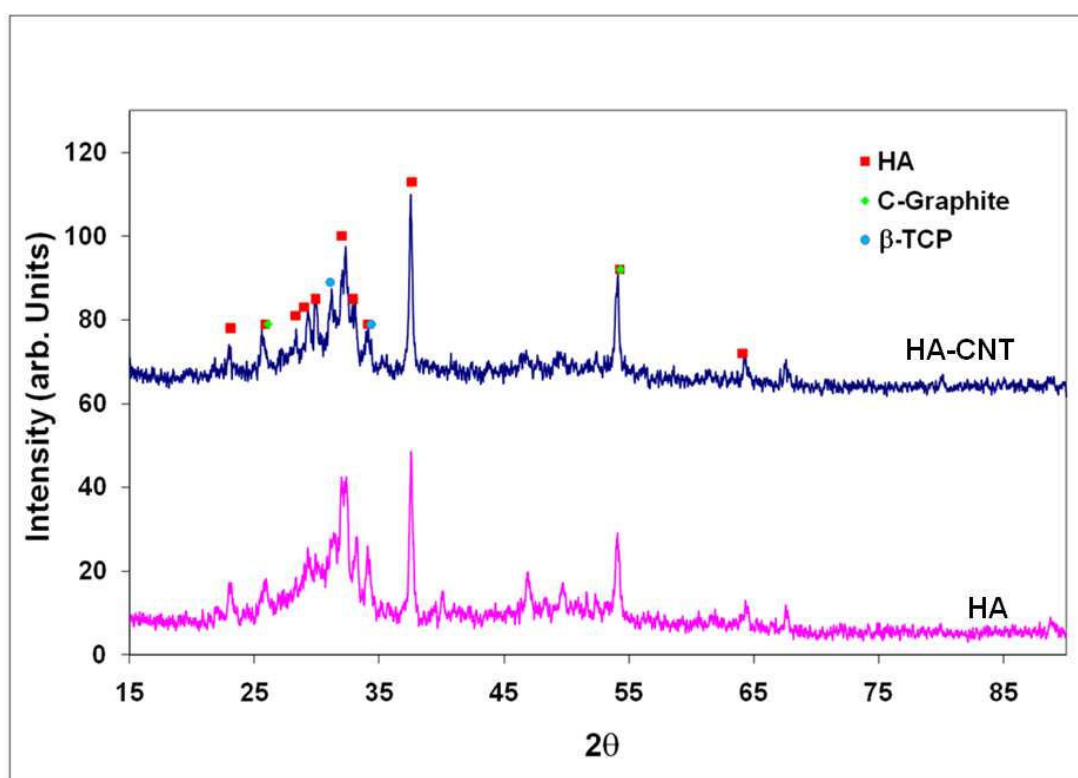


Figure S2. X-ray diffraction patterns (using  $\text{CuK}_\alpha$ ) from plasma sprayed HA and HA-CNT coatings. Both coatings show HA as the major phase. A small amount of  $\beta$ -TCP phase is also observed which is due to partial dissociation of HA during plasma spraying. Such dissociation is characteristic of plasma spraying technique which involves high temperature exposure. Graphite peaks are also observed due to presence of 4 wt. % CNTs. Carbon nanotubes were characterized effectively by Raman spectroscopy and SEM.

## Effect of CNT reinforcement on HA – Fracture Toughness, Wear Resistance and Biocompatibility

CNTs are used as reinforcement to plasma sprayed HA coatings for increasing the fracture toughness and wear resistance. Addition of 4 wt.% CNT increases the fracture toughness of HA coating to  $3 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{0.5}$ , which is an improvement by 350% over HA. Increase in the fracture toughness is largely attributed to the crack bridging by CNTs as shown in figure S3. Wear resistance of HA-CNT coating is also improved significantly (~80%), which is attributed to the enhanced fracture toughness and lubrication offered by peeled-off CNT walls [1-2]. HA-CNT does not show cytotoxic effect to macrophages and osteoblasts, the two most important cell lineage for orthopedic application.

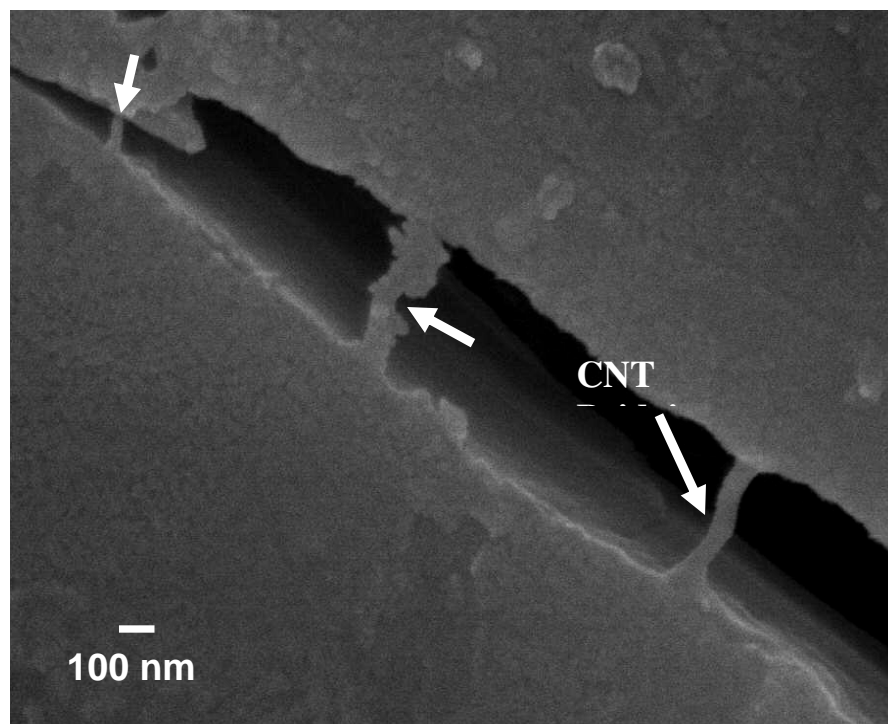


Figure S3. CNT bridges offer improved fracture toughness and wear resistance in HA-CNT coating by resisting crack propagation.

### ***1.3 Résultats et discussion***

Le recouvrement de surface par de l'hydroxyapatite est utilisé depuis une vingtaine d'année pour tenter d'améliorer l'ostéointégration des implants orthopédiques. Malgré l'ajout de l'HA, les descellements ont persisté, car l'HA reste fragile à l'usure et peu résistante aux contraintes de cisaillement (Wang *et al*, 2009). Nous avons donc voulu utiliser dans cette étude, les nanotubes de carbone (NTC) connus pour leur fort coefficient d'élasticité (Iijima, 1991), pour le renforcement de surface des implants en titane. En effet, les NTC ajoutés à la poudre d'hydroxyapatite (HA) projetée sont censés augmenter la résistance à la fracture et l'usure de l'HA (Balani *et al*, 2007). Les études préliminaires mécaniques démontrent que l'addition de NCT à un pourcentage de 4% dans la poudre d'HA, augmente la résistance à la fracture de l'HA de  $3 \text{ MPa.m}^{0.5}$ , ce qui représente une amélioration de ses propriétés mécaniques de 350% (Campbell, 2003). Cette augmentation de résistance à la fracture est attribuée aux « ponts », que réalisent les NTC entre les cristaux d'HA. La résistance à l'usure du revêtement mixte HA-NCT est aussi augmentée de façon significative (80%), grâce à l'effet multi-parois des CNT démultipliant la surface d'accrochage des cristaux d'HA (Poitout, 2004).

L'analyse des résultats cliniques, histologiques et microscopiques montre que l'addition des NTC permet la néoformation de tissu osseux autour des implants nanostructurés et ce sans aucun effet délétère sur les cellules et les tissus. Aucune ostéolyse n'est constatée et l'ostéointégration des implants au revêtement mixte NTC-HA est excellente, comme en témoigne le liséré ou *coating* vu sur les coupes histologiques, qui est resté attaché à l'os natif. Ces implants sont biocompatibles : l'aspect de la moelle osseuse et de l'os induit autour de l'implant ou à distance, est morphologiquement normal ; de même que l'organisation et la morphologie des cellules autour des implants. Nos implants en titane HA-NTC n'induisent aucun phénomène de nécrose, ni de réaction inflammatoire (Kostarellos *et al*, 2009), ni de formation de granulomes sur corps étrangers (Cheng *et al*, 2009). Aucun effet cytotoxique n'est constaté sur les macrophages, phagocytes, ostéoblastes ou ostéocytes.

Nos résultats démontrent que la présence de NTC permet l'accélération de la formation d'os (Usui *et al*, 2008), ainsi que de sa minéralisation et permet même d'inhiber la résorption ostéoclastique (Narita *et al*, 2009). Les NTC en stimulant la prolifération ostéoblastique et leur adhésion (Akasaka *et al*, 2006), permettent d'enclencher une

accélération des phénomènes de réparation tissulaire. Ils sont aussi capables de former une matrice de taille nanométrique permettant la synthèse des cristaux naturels d'HA (Usui *et al*, 2008) (Zanello *et al*, 2006) (Aryal *et al*, 2006) (Muller *et al*, 2008). Ainsi la meilleure adhésion à l'os constatée avec les implants composites NTC-HA peut être attribuée au phénomène de nucléation de l'apatite à la surface des NTC, avec un effet d'ancrage plus important (Balani *et al*, 2007) (Kostarelos *et al*, 2009) (Usui *et al*, 2008). Les NTC étant multi-parois, la surface d'ancrage est aussi augmentée par rapport à des NTC simples parois. Au total ce composite mixte permet une démultiplication de l'ancrage de l'os néoformé autour des implants en titane.

Une des approches nouvelle de cette étude *in vivo* est la mesure comparative des valeurs du coefficient d'élasticité (E) ou module de Young, sur l'os néoformé autour des 3 types d'implants : titane nu, titane recouvert d'HA et titane recouvert d'HA-NTC. Cette étude mécanique permet indirectement de prédire l'effet des contraintes à l'interface implant titane/os. Le revêtement de surface (*coating*) de type HA ou HA-NTC permet une décroissance progressive du module d'élasticité, car il y a du néotissu en formation au niveau de l'interface *coating*/ os. Cela permet d'éviter les effets dits de laminage. Lors de la synthèse d'un tissu osseux, les ostéoblastes initialement jouent un rôle actif dans la formation de la matrice de collagène de type I autour de l'implant. A cause de la porosité du *coating*, les fibres de collagènes, peuvent rentrer et pénétrer dans celui-ci (Liu *et al*, 2008) rendant l'ostéointégration plus efficace et dans le même temps cela modifie la valeur de E du *coating*. La présence d'HA dans le *coating*, de même nature chimique que les cristaux contenus dans l'os favorise également l'induction osseuse et la biointégration des implants fonctionnalisés en surface.

Les valeurs du coefficient d'élasticité du revêtement mixte HA-NTC sont plus élevées que celles du revêtement simple HA, prouvant l'effet de nanorenforcement du coating par des NTC *in vivo*. Le nouvel os formé autour de l'implant en titane nu a une valeur de E plus faible par rapport aux implants fonctionnalisés. Ainsi la présence d'HA sur la surface de l'implant améliore la minéralisation de l'os néoformé. Mais en comparant les 2 implants fonctionnalisés, la valeur de E est plus grande pour le *coating* mixte HA-NCT. Les NTC favorisent la différenciation et la prolifération cellulaire (Balani *et al*, 2007) (Usui *et al*, 2008). L'implantation de NTC seuls dans des *calvaria* de rats a permis l'accélération *in vivo* de la formation de tissu osseux (Hahn *et al*, 2009). De plus, Narita rapporte dans une étude de



2009, que les NTC sont capables d'inhiber la prolifération des cellules ostéoclastes (Naria *et al*, 2009). Le coefficient d'élasticité sur l'os à distance était identique sur tous les types d'explants, indiquant que l'adjonction de NTC n'a pas eu d'effet délétère sur l'os natif.

Les résultats de cette première étude démontrent que les NTC peuvent être utilisés comme nanorenforcement de l'hydroxyapatite pour recouvrir en surface les implants orthopédiques en titane. La forte adhésion de l'os aux implants en titane au revêtement composite HA-NTC (suggéré par le liseré de *coating* resté attaché sur les coupes histologiques) permet de conclure, que l'addition de NTC permet d'accélérer la croissance de l'os et donc l'ostéointégration des implants. Le coefficient d'élasticité sur l'os néoformé est comparable à celui de l'os à distance des implants, suggérant également les bonnes propriétés mécaniques de ce néo-os induit. Mécaniquement, il avait été prouvé dans des pré-études, que la projection plasma du composite HA-NTC favorisait l'augmentation de la résistance à l'usure et aux forces de cisaillement (Banlani *et al*, 2007) (Hahn *et al*, 2009) du *coating* : cette étude *in vivo* et *in situ* le confirme. Avant d'envisager une application clinique, une implantation sur animaux d'une durée plus longue (d'au moins un an) semble nécessaire, pour s'assurer dans le temps, d'une part de l'absence de cytotoxicité et d'autre part de la pérennisation de la qualité mécanique de l'ostéointégration de nos implants composites. Pour les chirurgiens orthopédistes, l'ostéointégration des prothèses articulaires continue à représenter un challenge en terme de qualité, de rapidité et de durée, qui semble pouvoir être résolu par l'adjonction (ou nanorenforcement) de NTC à l'HA projetée à la surface des prothèses.

*Durant ce travail, nous nous sommes intéressés non seulement à la fonctionnalisation d'implants en titane rentrant dans la catégorie de biomatériaux de remplacement mais aussi à des biomatériaux injectables ou implantables sous forme de capsules ou membranes.*

## **II - Fonctionnalisation de capsules ostéoinductrices (Publication n°2)**

**“ Active multilayered capsules as a new strategy for in vivo bone formation ”**

FACCA S, CORTEZ C, MENDOZA-PALOMARES C, MESSADEQ N, DIERICH A,  
JOHNSTON APR, MAINARD D, VOEGEL JC, CARUSO F, BENKIRANE-JESSEL N.

*PROC NATL ACAD SCI, USA, 2010, 107, 3406-1*



## **II.1 Résumé du travail**

### **Objectifs**

Il avait été préalablement démontré que des facteurs de croissance (BMP-2 et TGF- $\beta_1$ ) incorporés dans un film de multicouches de polyélectrolytes plan pouvaient induire *in vitro*, la différenciation de cellules souches en cellules osseuses ou cartilagineuses (Dierich *et al*, 2007). Cette stratégie intéressante, nécessite néanmoins pour une utilisation *in vivo*, une implantation du substrat, sur lequel nous avons construit le film de multicouches et incorporé des facteurs de croissance. Afin de s'affranchir de ce facteur limitant, une autre stratégie consiste à utiliser des capsules de multicouches sphériques (Caruso *et al*, 1998). Ces capsules de multicouches sphériques sont alors injectables ou incorporables dans un gel biodégradable pour faciliter leur implantation. Il était donc intéressant, d'une part de voir *in vitro* l'effet de ces facteurs de croissance incorporés dans des capsules de multicouches de polyélectrolytes sur des cellules souches embryonnaires, et d'autre part de tester l'activité de ces capsules *in vivo* par une implantation ectopiques sur des souris, en utilisant un gel d'alginate comme matrice extra-cellulaire. A terme, notre objectif sera de fonctionnaliser un biomatériau capable d'activer la réparation osseuse altérée localement sur le squelette osseux.

### **Méthodes**

Comme biomatériau, nous avons choisi un système sphérique de type capsule construit sur le modèle couche par couche : avec de l'acide poly- $\ell$ -glutamique (P $\ell$ GA) et du poly- $\ell$ -lysine (P $\ell$ L) en y incorporant deux facteurs de croissance : à la fois de la BMP-2 et du TGF- $\beta_1$ . Ces particules nanostructurées et fonctionnalisées avec des facteurs de croissance pouvant induire une différenciation en lignée osseuse des cellules souches embryonnaires, ont été testés sur des corps embryoïdes (EB), puis ont été implantées en sous-cutané sur des souris « nude ». Après explantation, les capsules et leur tissu périphérique ont été analysés par histologie, immunofluorescence et en microscopie électronique.

## Résultats principaux

Afin de vérifier la bonne construction des capsules, nous avons analysé en microscopie confocale, la formation du film de multicouches de polyélectrolytes autour des capsules. Ces capsules ayant 2 épaisseurs différentes (3  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$ ) ont été formées en utilisant des noyaux de silice de taille différente, qui ont été secondairement dissous. L'enveloppe externe des capsules formées comprend bien les couches de PLL et PLGA et les protéines BMP-2 et TGF- $\beta_1$  à l'intérieur du film. La comparaison entre les capsules fonctionnalisées par BMP-2 et TGF- $\beta_1$  et les capsules sans facteurs de croissance montre clairement que sans facteurs de croissance, les capsules nanostructurées sont plus fines, ce qui démontre encore une fois une bonne incorporation de nos 2 facteurs de croissance.

*In vitro*, nos résultats histologiques indiquent, que les capsules ainsi fonctionnalisées par BMP-2 et TGF- $\beta_1$  procurent bien un environnement favorable à la différenciation ostéogénique des cellules souches dérivées des EB. Nous avons bien pu visualiser : en microscopie électronique les ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes présentant les caractéristiques classiques, ainsi qu'une biominéralisation à 21 jours de culture en présence des particules multicouches de (PLL-PLGA)<sub>5</sub>-PLL-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL.

*In vivo*, l'analyse histologique les capsules fonctionnalisées par BMP-2 et TGF- $\beta_1$  implantées dans du gel d'alginate sont capables d'induire une différenciation ostéogénique des cellules souches dérivées des EB. Le gel d'alginate ajouté lors de l'implantation est nécessaire, car il représente une « gel » matrice. La différenciation des ostéoblastes au sein d'un tissu osseux minéralisé est aussi visualisé après coloration au Von Kossa au bout de 21 jours de culture sur les ostéoprogéniteurs en présence des particules multicouches de (PLL-PLGA)<sub>5</sub>-PLL-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL. En terme de contrôle, nous avons démontré que les capsules non fonctionnalisées n'induisent pas de formation osseuse.

## Conclusions du travail

Nos résultats prouvent que nous sommes capables d'induire *in vitro* tout comme *in vivo*, la néoformation de tissu osseux minéralisé par les cellules souches embryonnaires, via ces capsules de multicouches nanostructurées incorporant deux facteurs de croissance osseux.

**Mots clés :** capsules, BMP-2, TGF $\beta_1$ , corps embryoïdes, ostéoblastes, induction osseuse

## Active multilayered capsules for in vivo bone formation

S. Facca<sup>a,1</sup>, C. Cortez<sup>b,1</sup>, C. Mendoza-Palomares<sup>a,1</sup>, N. Messadeq<sup>c,1</sup>, A. Dierich<sup>c,1</sup>, A. P. R. Johnston<sup>b</sup>, D. Mainard<sup>d,e</sup>, J.-C. Voegel<sup>a</sup>, F. Caruso<sup>b</sup>, and N. Benkirane-Jessel<sup>a,b,e,2</sup>

<sup>a</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 977, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France; <sup>b</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire Université de Strasbourg (UdS), 1 place de l'hôpital, 67084, Strasbourg, France; <sup>c</sup>Center for Nanoscience and Nanotechnology, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Melbourne, Victoria 3010, Australia; <sup>d</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Institut Clinique de la Souris (ICS), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale INSERM/UdS, Collège de France, BP 10142, Strasbourg, France; <sup>e</sup>Unité Mixte de Recherches 7561, Centre National de la Recherche Scientifique-Université de Nancy, Faculté de Médecine, Vandoeuvre les Nancy, France; and <sup>f</sup>Center Hospitalier Universtaire de Nancy, Hôpital Central (service d'orthopédie) 29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 54000 Nancy, France

Edited by Jean-Marie P. Lehn, Université Louis Pasteur - ISIS, Strasbourg Cedex, France, and approved December 7, 2009 (received for review July 29, 2009)

Interest in the development of new sources of transplantable materials for the treatment of injury or disease has led to the convergence of tissue engineering with stem cell technology. Bone and joint disorders are expected to benefit from this new technology because of the low self-regenerating capacity of bone matrix secreting cells. Herein, the differentiation of stem cells to bone cells using active multilayered capsules is presented. The capsules are composed of poly-L-glutamic acid and poly-L-lysine with active growth factors embedded into the multilayered film. The bone induction from these active capsules incubated with embryonic stem cells was demonstrated in vitro. Herein, we report the unique demonstration of a multilayered capsule-based delivery system for inducing bone formation in vivo. This strategy is an alternative approach for in vivo bone formation. Strategies using simple chemistry to control complex biological processes would be particularly powerful, as they make production of therapeutic materials simpler and more easily controlled.

active biomaterials | layer-by-layer | nanostructured capsules | stem cells | tissue engineering

For decades, the treatment of degenerative cartilage and bone diseases has been a challenge for orthopaedic surgeons due to the apparent inability of cartilage and bone to repair itself. There is no effective therapy available and patients can only be helped by surgical joint replacement. An inherent major concern is the limited availability of autografts, which significantly reduces the number and type of treatable defects. Hence, new approaches are being developed, including cell grafting using cells grown in bioreactors with the appropriate growth factors (1, 2) and stem cell technology, as a source of transplantable material. Embryonic stem (ES) cells represent a valuable source for cell transplantation since their characteristic features include an unlimited self-renewing capacity and a multilineage differentiation potential (3, 4). As an example, ES-derived glial precursors and cardiomyocytes have been successfully transplanted, integrated, and shown to be functionally active in the transplantation site (5, 6). The yield of differentiation of ES cells into an intended lineage can be greatly enhanced by the addition of growth factors or induction substances. Whereas protocols for the differentiation of cardiomyocytes, neuronal cell types, insulin-producing cells, or adipocytes from ES cells have been available for many years (7–10), the differentiation of ES cells into elements of the skeleton has only recently been reported (11–14).

The identification of an entirely unique family of growth factors, bone morphogenetic proteins (BMPs), has led to an increase in the understanding of bone formation and regeneration (15). BMPs regulate cartilage and bone differentiation in the body as initiated by the binding of BMPs to specific cell-surface receptors (bone morphogenetic protein receptors). This activates a signalling cascade inside the cells that results in the production

and recruitment of proteins necessary for transformation into cartilage- and bone matrix-synthesizing cells, i.e., chondroblasts and osteoblasts, respectively (15). Bone formation or ossification continues through a series of events that include formation of cartilage, hypertrophy, and calcification of the deposited cartilage, vascular invasion, differentiation of osteoblasts and mineralization of bone. BMPs can therefore be used to initiate bone formation and growth if applied to a bone defect. However, an effective and efficient carrier matrix that maintains the biological activity and regenerating action of BMPs is required to deliver the proteins to the site of the defect (16–18).

The most widely used carrier matrices for BMPs are implantable collagen-based matrices. Notably, the FDA-approved absorbable collagen sponge matrix has been used in the therapeutic administration of BMPs (BMP<sub>2</sub>) since 1981. Granular forms of collagen for BMP<sub>2</sub> delivery are also used therapeutically. Also in preclinical and clinical trials are collagenous preparations obtained after extraction of BMPs from the bone matrix. Hydrogels of fibrin and alginate are also under investigation. In recent years, considerable effort has been devoted to the design and controlled fabrication of structured matrices with functional properties. Polyelectrolyte multilayer (PEM) films incorporating functional proteins and other bioactive materials provide one example (19). PEM films are prepared by the layer-by-layer (LbL) deposition of interacting materials, typically by the electrostatic interaction of oppositely charged polyelectrolytes (20). 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 (19–21). These supramolecular nanoarchitectures can be designed to exhibit specific properties, including control of cell activation, inflammation (22, 23) and localized drug, growth factor or nucleic acid delivery (24, 25). The embedded biomolecules, which are either chemically bound to polyelectrolytes or physically adsorbed, have been shown to retain their biological activity in many studies (22–26). 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 would be advantageous for progressive delivery of associated active agents

Author contributions: C.C., S.F., N.M., A.D., and C.M.-P. performed research; S.F., N.M., A.D., and C.M.-P. analyzed data; D.M., F.C., and N.B.-J. designed research; J.-C.V., F.C., and N.B.-J. wrote the paper; and C.C. and A.P.R.J. characterized the assembly of capsules.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>C.C., S.F., C.M.-P., N.M., and A.D. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: nadia.jessel@medecine.u-strasbg.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0908531107/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0908531107/DCSupplemental).



in comparison to the addition of the some molecules in solution (22–26).

Previously, we showed that embedding BMP<sub>2</sub> and the transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) within a PEM film on a planar substrate can drive ES cells to cartilage or bone differentiation (27). TGF $\beta_1$  (25 kDa) influences the proliferation and differentiation of the stem cells (28), while BMP<sub>2</sub> (26 kDa) stimulates the production of specific bone matrix proteins (29, 30). The proteins were embedded within a film of alternating layers of the polypeptides poly-L-lysine (PLL) and poly-L-glutamic acid (PGA) (31, 32). Local degradation of PLL/PGA films by cells attached onto the surface of such films has been proposed as the mechanism by which cells gain access to biomolecules embedded within films. In the present work, BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$  were embedded within colloidal multilayered capsules composed of PLL and PGA (33); the main advantage of a colloidal system over a planar system lies in the injectable format of colloidal particles as well as the higher surface area and improved accessibility provided by the particles. The versatility of the LbL technique allows for facile adaptation to a colloidal system—the multilayer is simply formed on a spherical substrate, which may be decomposed to form polymeric capsules with shells of nanosized thickness (34, 35). Proteins including antibodies have been adsorbed onto the surface of LbL-assembled capsules for targeting and sensing applications (36, 37). Drugs, nucleic acid, and proteins have been encapsulated within the capsule core and, more recently, active peptides have been embedded within the polymer layers of the capsule shell (38–40). Herein, we report the preparation of multilayered capsules incorporating BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$  and show both *in vitro* and *in vivo*, the induction of bone formation from embryonic stem cells. This work highlights the potential use of these biocompatible multilayered capsules in the injectable transplantation of embryonic stem cells for cell-based therapies.

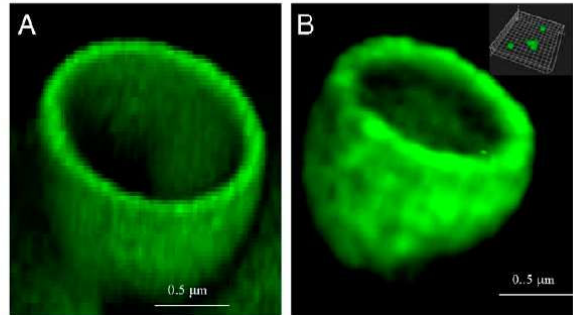
The most likely clinical application of our strategy would be, for example, after bone metastasis ablation. Myeloma and some secondary bone cancers produce factors that activate the osteoclasts. Bone is then dramatically fragilized, which often requires metastasis ablation and biomaterial implantation. In this case the biomaterial could be potentially functionalized by using our strategy.

### Results and Discussion

The embedding of BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$  within the PLL and PGA multilayer film was first analyzed on a planar surface using dual polarization interferometry (DPI). DPI provides real-time kinetic information on the deposition of materials during film assembly and allows determination of properties such as thickness and mass of the film in solution. Fig. S1 shows the exponential increase in thickness and mass with layer number, as expected for exponentially growing PLL/PGA multilayer films (41). The deposition of BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$  on the underlying PLL layers results in an increase in both thickness and mass, which indicates the successful embedding of the negatively charged proteins within the film architecture. The thicknesses obtained upon BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$  adsorption (3.4 nanometer (nm) and 4.5 nm, respectively), are consistent with the reported dimensions for both proteins, assuming that the proteins adsorb laterally or in a “side-on” configuration (42, 43). The protein mass coverage was approximately 5.2 mg/m<sup>2</sup> and 7.4 mg/m<sup>2</sup> for BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$ , respectively.

Characterization of the embedding of BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$  within PLL/PGA multilayers deposited on spherical colloidal templates was performed using microelectrophoresis, Fig. S2. Microelectrophoresis yields the zeta potential of the particles, which is related to the overall surface charge of the particle. The alternating zeta potentials observed for the protein deposition steps suggest the incorporation of BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$  in the multilayers.

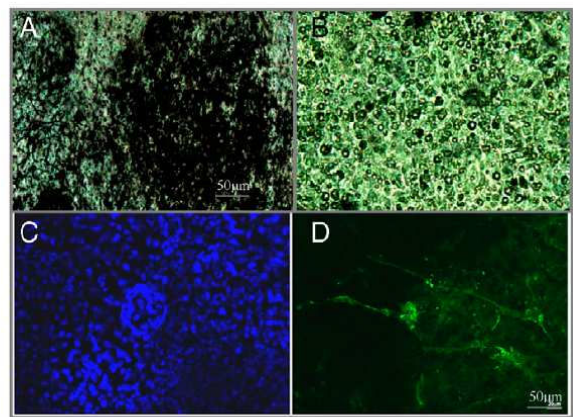
Capsules were formed by deposition of the PLL/PGA multilayers (primed with an initial layer of polyethyleneimine) on



**Fig. 1.** Confocal microscopy images of 1  $\mu\text{m}$  fluorescently labeled capsules with shells comprising of PLL and PGA without embedded proteins (A) or after incorporation of BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$  and dissolution of the core: PLL-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL<sup>ITC</sup> (fluorescein isothiocyanate) (B). The hollow cross-section of the capsules is depicted. The *Inset* shows dispersed capsules.

1  $\mu\text{m}$  spherical silica particles followed by the dissolution of the silica core template. Confocal microscopy images of the resulting hollow capsules are shown in Fig. 1. In this study, we investigated two multilayer architectures differing only by the presence or absence of BMP<sub>2</sub> and TGF $\beta_1$ : PEI-(PGA-PLL)<sub>4</sub> and PEI-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL (Fig. 1A and B). The above results suggest the incorporation of two active proteins into PLL/PGA multilayered capsules, which provide a unique system for tissue engineering applications.

During embryo development, bone formation or ossification progresses in two steps: (i) chondrocytes arise after mesenchymal condensation; and (ii) they become hypertrophic as characterized by the expression of collagen type II and by calcification. To test for initial bone formation, embryoid bodies (EBs) were grown in contact with PEI-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL multilayered capsules or with PEI-(PGA-PLL)<sub>4</sub> as a control. We analyzed the differentiation of the EBs, cultured in the presence of insulin and ascorbic acid, after 21 days by performing von Kossa staining, which is a marker for calcification that indicates the differentiation of EBs into mineralized bone structures. The von Kossa staining (Fig. 2) clearly showed the presence of large



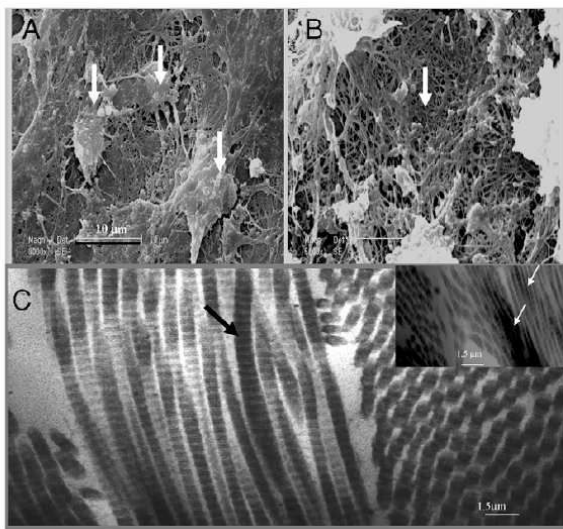
**Fig. 2.** The von Kossa staining of EBs differentiated in the presence of (A) PLL-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL or (B) PLL-(PGA-PLL)<sub>4</sub> multilayered capsules. Osteopontin expression by immunocytochemistry of EBs growing in the presence of the multilayered particles PLL-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL differentiated to the osteoblast lineage (C and D). Counterstaining of the cells was done by a Hoechst treatment (Blue) and the immunostaining for osteopontin-expressing cells (Green). No specific labelling was detected in control samples (multilayered capsules without BMP-2 and TGF- $\beta$ ) (Fig. S5).



areas of mineralized structures (in black) in the presence of  $\text{BMP}_2$ - and  $\text{TGF}\beta_1$ -containing capsules (Fig. 2A), whereas only sporadic black-stained areas were visible from EBs incubated with control capsules (Fig. 2B). This suggests that  $\text{BMP}_2$  and  $\text{TGF}\beta_1$  induced EBs to transform into hypertrophic chondrocytes and hence into mineralized osteocalcin-expressing osteoblasts. The osteogenic differentiation of ES cell-derived EBs, as stimulated by  $\text{BMP}_2$  and  $\text{TGF}\beta_1$ , indicate sufficient interaction of the EBs with the functionalized particles (core/shell) or capsules. In experiments with free growth factors, it was observed that without adding growth factors after each change of the medium, no specific mineralization was detected. The use of multilayered film capsules containing the growth factors appears to protect the growth factors from degradation and act as a reservoir for the cells. The von Kossa staining is not sufficient to prove bone formation, but the mineralized structure visualized here clearly indicates the onset of bone induction.

The presence of osteopontin, a glycoprotein product secreted extracellularly by osteoblasts, is another indication of the generation of osteoblasts from the EBs. The presence of osteopontin was determined by immunocytochemistry of the resulting cells. The fluorescence exhibited by the cells grown in the presence of protein-embedded PLL/PGA capsules (see Fig. 2D) demonstrates the expression of osteopontin as induced by the  $\text{BMP}_2$  and  $\text{TGF}\beta_1$  embedded in the multilayered capsules. Capsules without growth factors showed no significant osteopontin expression (Fig. S5). In our previous study (27), we have shown by room temperature (RT) PCR that after 21 days of culture of the same cells used in this experiment and with the same growth factors incorporated into planar multilayered films, bone induction markers including osteopontin and osteocalcin were expressed by the cells.

In support of this observation, SEM images (Fig. 3) of the cell mass generated from growth in the presence of the active multi-



**Fig. 3.** SEM images of osteoblasts from EBs growing in the presence of PEI-(PGA-PLL)<sub>2</sub>- $\text{BMP}_2$ -PLL- $\text{TGF}\beta_1$ -PLL particles. (A): Osteoblast visualizations; (B): mineralized collagen fibers (zoom  $\times 40$ ). In the presence of the multilayered particles without  $\text{BMP}_2$  and  $\text{TGF}\beta_1$ , osteoblasts or bone matrix were not observed. (C) TEM observation after *in vivo* bone induction by EBs growing in the presence of the alginate gel and PLL-(PGA-PLL)<sub>2</sub>- $\text{BMP}_2$ -PLL- $\text{TGF}\beta_1$ -PLL particles: bundle of collagen fibrils seen in longitudinal and transverse section. The arrows indicate the type I collagen fibrils viewed in longitudinal section. Note the characteristic cross striation and periodicity of this type of collagen (67 nm/0.5  $\mu\text{m}$ ). The mineralization of the collagen fibers is also visualized in the *Inset*.

layered capsules show the osteoblasts actively produce a bone matrix as well as mineralized collagen fibers. As a control, by using the multilayered capsules without  $\text{BMP}_2$  and  $\text{TGF}\beta_1$ , we did not observe any osteoblasts in the cell mass generated from growth.

There is a large demand for new bone regeneration to restore function during bone injuries. Bone filling materials, such as implants, are important in bone tissue restoration. During the three major phases of osteogenesis; (i) proliferation, (ii) ECM deposition and maturation, and (iii) mineralization, the expression pattern of typical markers is organized temporally and sequentially. Our results indicate that we are able to induce osteogenesis from embryonic stem cells, mediated by growth factors embedded in multilayered particles. We observed, by SEM the *in vitro* transformation of undifferentiated embryonic stem cells to the osteoblastic phenotype (Fig. 3).

For the *in vivo* experiments, we initially tested the subcutaneous injection of capsules and EB mixed in a single formulation. We were not able to induce bone formation using this strategy. It is possible that EBs require a three-dimensional environment for growth, such as an alginate gel matrix (used for tissue engineering), to increase their contact with the capsules. Hence, for *in vivo* experiments, samples were incubated in the presence of alginate gel as a substrate for the implantation. Samples were cultured in differentiation conditions (in the presence of the active particles) over 5 days prior to subcutaneous implantation into MF1-*nu/nu* mice (Fig. 4). As a control, we also implanted the gel-containing particles without any growth factors (See Fig. S4). We did not observe inflammation (no fibrosis in the site of implantation). Bone forming cells were observed within the implant, and we also observed vascularization surrounding and infiltrating the implant (Fig. 4B and C). We have also shown no osteopontin detection when the capsules were without any growth factors (see Fig. S5).

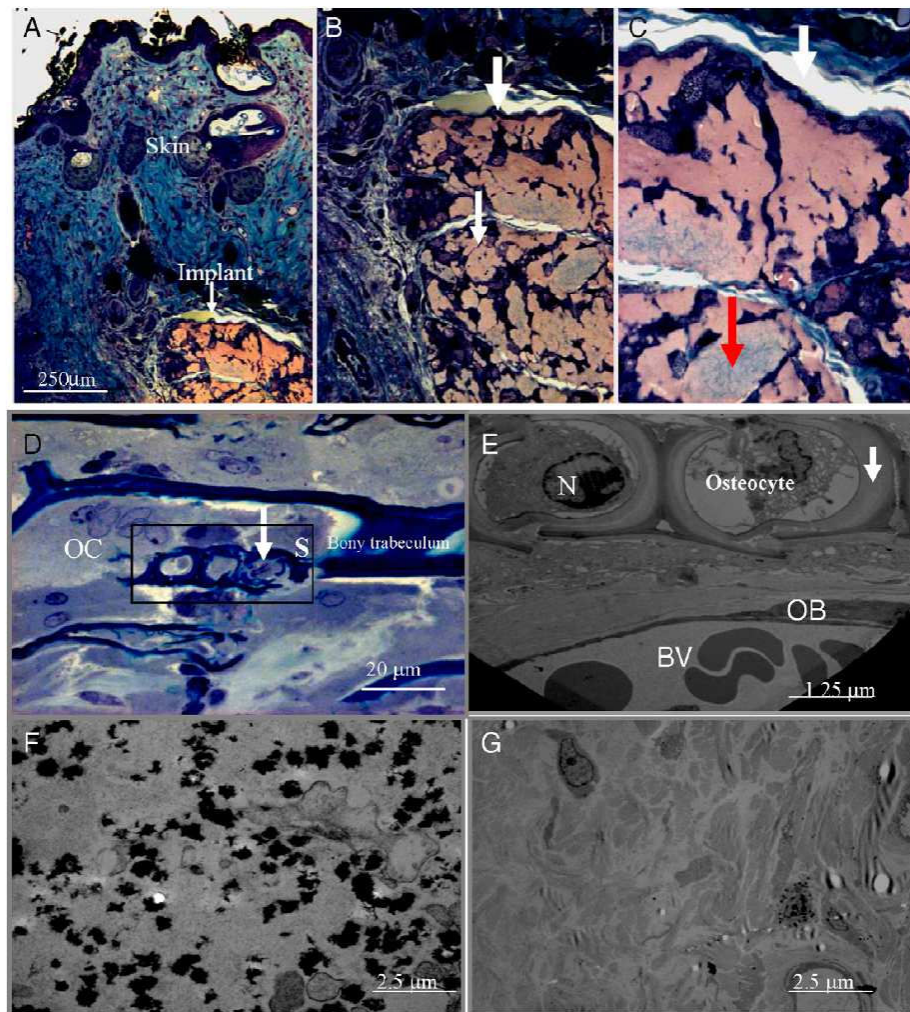
Semithin sections (2  $\mu\text{m}$ ) of the implant were taken and stained with toluidine blue. By optical microscopy, we visualized different cells of bone: (i) osteocytes into their lacuna with bone matrix; (ii) osteoclasts; and (iii) osteoblasts (Fig. 4D). In Fig. 4D, the toluidine blue staining helps in the visualization of all types of cells, including the osteoclast with multiple nuclei compared to the osteoblast with one nucleus, and the osteocyte in their lacuna. The presence of osteocyte in the lacuna is specific for bone formation. While visualizing the different types of cells associated with bone suggests bone induction, it is not sufficient to claim bone formation. However, the observation of osteocytes into the lacuna and bony trabeculum suggests bone formation.

We also analyzed in more detail section (S), as represented in Fig. 4D. By TEM we observed: (i) the osteocytes in their lacuna (osteoid) with bone matrix as mature bone cells embedded in calcified bone matrix; (ii) the osteoclast and osteoblasts as nondividing cells actively producing bone matrix; and (iii) the osteoid in the layer of nonmineralized matrix adjacent to the osteocyte membrane, indicating the first stage in bone formation (Fig. 4E).

For further characterization, we also analyzed by TEM the *in vivo* induction of biomineralization by observing calcium phosphate deposits (Fig. 4F). As a control, by using the capsules without growth factors, no hydroxyapatite crystal growth was detected (Fig. 4G). We also analyzed the structure of the induced bundle of collagen fibrils in longitudinal and transverse sections (Fig. 3C). In the negative control (capsules without any growth factors), collagen type I, which is not specific for bone, was observed along with fibroblasts (Fig. S3). In this control, we did not detect collagen type II, which is normally indicative of cartilage induction and, consequently, bone formation (27).

Our results clearly indicate that we are able to induce *in vivo* bone formation by using alginate gel as a matrix for embedding EBs and active multilayered particles. For the *in vitro* experiments, we were able to induce bone formation, which is probably





**Fig. 4.** Optical microscopy observation after in vivo implantation of EBs growing in the presence of the alginate gel and PEI-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGFβ<sub>1</sub>-PLL particles. Subcutaneous region visualization. (A): Section of skin with epidermis, dermis and the implant (Orange) at zoom ×10. (B): Implant at zoom ×20. (C): Implant at zoom ×40. The size of the implant is 540 nm length and 320 nm width. The white areas represent the vascularization, and the grayish-green area suggests bone induction (Red arrow). (D) Observation after semithin sections (2 μm) and staining with toluidine blue of different cells of bone, osteocytes into their lacuna with bone matrix indicated by arrows, osteoclast (OC) and osteoblasts (OB) (zoom ×20). (E) Section S of the osteocytes into their lacuna (observed by TEM). Observation of osteocytes with bone matrix indicated by arrows, OC and OB, with vascularization and blood vessels visualization. Bone matrix visualization (indicated by arrows). N (Nucleus). (F) Bone formation and visualization of calcium phosphate deposits (dark areas) specific to biomineralization after in vivo bone induction by EBs growing in the presence of the alginate gel and PEI-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGFβ<sub>1</sub>-PLL capsules. (G) Visualization after in vivo implantation of EBs growing in the presence of the alginate gel and capsules without growth factors

due to the close proximity of the cells with capsules. For the in vivo experiments, initial ectopic injection of the active multilayered capsules and stem cells did not result in bone induction, which suggests that the capsules may be able to diffuse away from the site of injection, thus delivering a much lower concentration of the growth factors to the EBs.

Previously, we determined the mechanism by which cells come in contact and interact with active proteins, peptides, drug, or DNA incorporated into the multilayered PLL/PGA films (21–24). We have shown that when in contact with planar multilayered films, the cells locally degrade the film (by the secreted proteases able to degrade PLL and PGA) and develop pseudopods. By these two mechanisms, local degradation and chemotaxis, the cells interact with active molecules incorpo-

rated into the multilayered film (21). We have also shown that by using the enantiomer D of PLL and PGA, the cells cannot degrade the film and are not able to interact with embedded active molecules into the multilayered film (21). Therefore, in the capsule system presented here, we assume that we do not have passive release of the growth factors, and that we have close interaction between the cells and the active molecules incorporated in the capsules. This suggests that in our system, release and delivery occurs when the films are in close proximity to the cells.

We have also previously shown that by only mixing BMP<sub>2</sub> and TGFβ<sub>1</sub> with alginate and cells, we are not able to induce bone formation at 21 days of culture without adding the growth factors after each change of the medium. By using the capsules, we did



not need to add any growth factors, showing again the stability of the active molecules when incorporated into the multilayered capsules.

These films are of nano/micro-metric size: (i) Their nanometric size allows functionalizing the systems with very few active molecules (here BMP<sub>2</sub> and TGFβ<sub>1</sub>). Due to the nanometric size these active molecules can be concentrated over a very small thickness, allowing very small amounts to achieve biological activity. (ii) The nanometric size of the systems and in particular the possibility to design them precisely over a nanometric scale by embedding active materials at different locations in a film allow fine-tuning of the biological activity of these films as has been demonstrated in the past. (iii) The sequential biological tuning by two or more molecules is possible by the layer-by-layer technology.

In a recent study, it was reported that a preformed cartilage template was necessary for effective bone formation *in vivo* (44). Initial attempts to directly differentiate embryonic stem cells based on differentiation protocols and media/growth factor formulations yielded positive *in vitro* results, but did not result in bone formation *in vivo*. In the current study, we have shown that by implanting an alginate gel matrix to restrict particle mobility and increase contact with cells, we are able to induce bone formation without the need for a cartilage template. The significant advance of this work is that no predifferentiation is required and that no cartilage template as a scaffold was needed. This work is also a unique demonstration of the use of a multilayered capsule-based delivery system for inducing bone formation *in vivo*. By using this formulation, we can incorporate different kinds of active molecules aimed at different applications, such as gene therapy, drug therapy, or tissue engineering. This innovative approach, should also find applications in other domains of complex tissue restoration.

## Methods

**Chemicals.** Poly-(L-lysine) hydrobromide (PLL, MW = 30.3 KDa), polyethyleneimine (PEI), polyglutamic acid (PGA, MW = 47, 5 KDa), and poly-(L-lysine)-FITC, were purchased from Sigma. BMP<sub>2</sub>, TGFβ<sub>1</sub>, the antibody OPN (AKm2A1) sc-21742 and the goat antimouse IgG-Alexa were from R&D system (Europ Ltd, Abingdon, UK). Bisbenzimidazole H 33258 (Hoechst) used for microscopy was purchased from Invitrogen. Alginate sodium salt, low viscosity was purchased from Alfa Aesar, and the CaCl<sub>2</sub> was from Sigma.

**Embedding of BMP<sub>2</sub> and TGFβ<sub>1</sub> in PLL/PGA Multilayers-DPI Analysis.** The incorporation of both BMP<sub>2</sub> and TGFβ<sub>1</sub> into PLL/PGA films was investigated using dual polarization interferometry. A silicon dioxide sensor (lightly doped with silicon nitride) was used as the template for the LbL assembly of PLL/PGA and the subsequent embedding of the proteins. The sensor was mounted on the instrument and degassed Milli-Q water was flowed over the sensor at a flow rate of 50 μL min<sup>-1</sup>. Once the baseline sensor response was stabilized, an 80% ethanol/water mixture was flowed (50 μL min<sup>-1</sup>) over the sensor for 4 min followed by Milli-Q water, allowing the baseline to stabilize once again. This was repeated a further two times to ensure that any trace surface contamination was removed. The syringes were then filled with 50 μM methanesulfonic acid (MES), pH5.5 (running buffer), which was flowed over the sensor at 50 μL min<sup>-1</sup>. The baseline was allowed to stabilize. The refractive index of the buffer, used in subsequent layer calculations, was determined by comparing the instrument response with that of water, which has a known refractive index.

The flowrate of the running buffer was reduced to 20 μL min<sup>-1</sup> and 1 mg mL<sup>-1</sup> of polyethyleneimine (25,000 g mol<sup>-1</sup> in 50 mM MES, pH 5.5) was injected and flowed over the sensor for 10 min. The running buffer was flowed to rinse the sensor after PEI adsorption (25 μL min<sup>-1</sup> for 8 min or until stable). The sample needle and injection loop were rinsed with 1 mL of MES for cleaning before the next polyelectrolyte injection. PGA (1 mg mL<sup>-1</sup> in MES) was then injected and flowed over the sensor for 10 min (at 20 μL min<sup>-1</sup>). Rinsing of the sensor and injection loop was followed as described previously. Alternating layers of PLL and PGA were then deposited on the sensor until a total of nine layers of polyelectrolyte had been deposited (including the initial PEI layer), with the terminating layer being PLL. After rinsing the sensor, BMP<sub>2</sub> (0.1 μg mL<sup>-1</sup>; negatively charged) was injected at 5 μg mL<sup>-1</sup> for 30 min. The sensor was rinsed once again and a

PLL layer was deposited before injection of TGFβ<sub>1</sub> (0.2 μg mL<sup>-1</sup>; negatively charged) onto the sensor at 5 μL min<sup>-1</sup> for 30 min. A final PLL layer was deposited before rinsing with running buffer. Thickness and mass values were determined using the bulk refractive index calculated during calibration.

**Embedding of BMP<sub>2</sub> and TGFβ<sub>1</sub> in PLL/PGA Core-Shell Particles and Capsules.** Polystyrene particles (1 μm) were coated via LbL with three layers of PLL and PGA as described above and resuspended in 500 μL of 50 mM MES, pH 5.5. Then 100 μL of PLL-terminated particles were incubated overnight with 0.2 mg mL<sup>-1</sup> of BMP<sub>2</sub> at 4 °C. After washing once with MES, a layer of PLL was adsorbed for 20 min, followed by three cycles of MES washing. TGFβ<sub>1</sub> (0.2 μg mL<sup>-1</sup>) was then deposited by overnight incubation at 4 °C. The particles were washed twice to remove unbound protein and were again incubated with a final layer of PLL for enhanced cell attachment. A small volume (4 μL) was removed after each deposition step for zeta potential measurement.

For capsule formation, silica cores (1 μm) were used instead of polystyrene particles. An initial layer of PEI was deposited followed by the deposition of polypeptides and proteins in the following order: PGA-PLL-PGA-PLL-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGFβ<sub>1</sub>-PLL. The cores were dissolved by the addition of 2 M hydrogen fluoride/8 M ammonium fluoride (pH 5) and the formed capsules were washed four times with 50 mM MES, pH 5.5. Confocal microscopy images of the capsules were taken using a Leica TSC SP2 confocal unit (Leica Microsystems). In this study, the overall concentration incorporated was 0.1 μg mL<sup>-1</sup> of BMP<sub>2</sub> and (0.2 μg mL<sup>-1</sup>) of TGFβ<sub>1</sub>. After dissolution of the core of the particles, the designed capsules were stored in the PBS or culture medium and visualized by confocal microscopy to show the dispersed capsules (Fig. S6).

**Cell Culture and Differentiation of Embryonic Stem Cells.** The mouse ES cell line D3 (gift from R. Kemler) was kept undifferentiated as described (11). To induce differentiation, the ES cells, free of feeder cells by extensive plating, were cultured in hanging drops (1,000 cells/30 μL) over 48 h in ES medium without LIF. The ES medium was supplemented with insulin (1 μg mL<sup>-1</sup>) and ascorbic acid (50 μg mL<sup>-1</sup>), and the fetal bovine serum was increased to 20%. The formed EBs were maintained in suspension from day three to five into ultralow adherent culture dishes (Stem Cell Technologies Inc) and then plated on coated coverslips into 4 or 24-well tissue culture plates. The effects of BMP<sub>2</sub> (10 ng mL<sup>-1</sup>), TGFβ<sub>1</sub> (2 ng mL<sup>-1</sup>), in various combinations on the differentiation for osteoblasts were examined. For all the experiments, we used 20 μL of the characterized particles or capsules per EB. The medium was changed every second day.

**Von Kossa Staining for Osteoprogenitors.** The differentiated cells were washed twice with PBS, and then fixed for 2 h at RT with 10% neutral buffered formalin. After washing with dH<sub>2</sub>O, the cells were stained 30 min with 2.5% silver nitrate (freshly prepared). After two washes with dH<sub>2</sub>O, the cells were counterstained for 10–15 s with 0.1% toluidine blue, washed again three times with dH<sub>2</sub>O and then air dried. The presence of mineralized structures (in black) was recorded by a cool snap camera coupled to a Leica DRBH microscope. We also checked the cartilage differentiation by alamar blue staining, and at this stage there was no differentiation in any chondrocytes activity (Proteoglycans secretion)

**Immunofluorescence for Osteopontin Expression.** The fluorescent dye used for the secondary antibody is Cy5. EBs growing in the presence of the multilayered particles PEI-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGFβ<sub>1</sub>-PLL were differentiated to the osteoblast lineage. For controls, EBs were differentiated on gelatinized coverslips in the presence of BMP<sub>2</sub>, TGFβ<sub>1</sub>, insulin and ascorbic acid (as a positive control; in this case, we added the growth factors after each change of the media; if not we had no bone induction) and fixed on day 21 with 2% paraformaldehyde. Immunocytochemistry was done as earlier described (31). Cells were first treated with a monoclonal mouse antiosteopontin antibody (OPN [AKm2A1]: sc-21742; Santa Cruz Biotechnology). The second antibody was a goat antimouse IgG (H+L). Counterstaining of the cells was done by a 20s Hoechst treatment (5 ng mL<sup>-1</sup>). Immunostaining for osteopontin-expressing cells (green) was monitored by a cool snap camera coupled to a Leica DRB microscope using a specific filter.

**Histological and Electron Microscopy Analysis.** The samples were fixed in Karnovsky fixative, postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at 4 °C, dehydrated through graded alcohol and embedded in Epon 812. Semithin sections were cut at 2 μm and stained with toluidine blue, and histologically analyzed by light microscopy. Ultrathin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined



with a Morgagni 268 electron microscope. For scanning electron microscopy, samples were fixed, dehydrated as above, dried with critical point-drying apparatus, and then mounted on aluminum stubs coated with palladium-gold using a cold sputter-coater and observed with a Philips XL-20 microscope.

**In Vivo Experiments.** For the in vivo experiments, samples were incubated in the presence of the alginate gel for the implantation. The alginate solution was prepared at 1% wt/wt in ultrapure water (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore, 18.2 M $\Omega$  cm). CaCl<sub>2</sub> solution was prepared at 0.05 M. Samples were then cultured in differentiation conditions in the presence or not of the active particles or capsules (20  $\mu$ L/EB) for 5 days prior to subcutaneous implantation into MF1-nu/nu (28–32 g, 4–5 weeks old). We implanted 200  $\mu$ L of the mixed (V/V) alginate and calcium gel as a control, or by adding the mixed capsules with or without growth factors (20  $\mu$ L/EB). As a control, we also implanted a mixture of alginate gel, growth factors and EBs. We im-

planted three EBs into the active gel/mice. For all in vivo studies, male MF1-nu/nu mice were purchased from Harlan and acclimatized for a minimum of one week prior to experimentation. All procedures were performed with prior received ethical approval and carried out in accordance with the regulations laid down for the animals.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank Professor Jean-Marie LEHN (ISIS, Strasbourg) for helpful discussions. We are grateful to A.N. Zelikin from the University of Melbourne for his assistance with the confocal visualization of the capsules. This work was supported by the project ANR06-BLAN-0197-01/CartilSpray, from the "Agence Nationale de la Recherche", the "Fondation Avenir", the "Ligue contre le Cancer, Région Alsace", "Cancéropôle du Grand Est," and the Australian Research Council. This project was also supported by the Program FAST between France and Australia. C.M. thanks the Faculté de Chirurgie Dentaire of Strasbourg for financial support. N.B.-J. is indebted to CHU de Nancy "Contrat d'interface INSERM vers l'hôpital".

- Oberts AB, Sporn MB (1990) The transforming growth factor-betas. In *Peptide growth factors and their receptors*, ed Sporn MB (Springer Verlag, Heidelberg, Germany), pp 421–472.
- Chen P, Carrington JL, Hammonds RG, Reddi AH (1994) Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. *Exp Cell Res*, 195:509–515.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ (1992) Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359:550–551.
- Doetschmann TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 87:27–45.
- Brüstle O, et al. (1996) Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science*, 285:754–756.
- Johkura K, et al. (2003) Survival and function of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in ectopic transplants. *Cardiovasc Res*, 58:435–443.
- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1994) Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and CAE channel blockers. *Differentiation*, 48:173–182.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev*, 59:89–102.
- Soria B, Skoudy A, Martin F (2001) From stem cells to beta cells: New strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 44:407–415.
- Dani C, et al. (1997) Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci*, 110:1279–1285.
- Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2003) In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation*, 71:18–27.
- Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, Ailhaud G, Dani C (2001) Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284:478–484.
- Buttery LDK, et al. (2001) Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng*, 7:89–99.
- Hegert C, et al. (2002) Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 115:4617–4628.
- Bessa PC, Casal M, Reis RL (2008) Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen M*, 2:1–13.
- Bessa PC, Casal M, Reis RL (2008) Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen M*, 2:81–96.
- Uludag H (2001) Delivery systems for BMPs: Factors contributing to protein retention at an application site. *J Bone Joint Surg Am*, 83:128–134.
- Uludag H (2000) Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res*, 50:227–236.
- Lynn DM (2006) Layers of opportunity: Nanostructured polymer assemblies for the delivery of macromolecular therapeutics. *Soft Matter*, 2:269–273.
- Decher G (1997) Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277:1232–1237.
- Jessel N, et al. (2003) Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv Mater*, 15:692–695.
- Benkirane-Jessel N, et al. (2004) Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents. *Adv Mater*, 16:1507–1511.
- Jessel N, et al. (2004) Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Adv Funct Mater*, 14:174–182.
- Jessel N, et al. (2006) Multiple and time scheduled in situ DNA delivery mediated by  $\beta$ -cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:8618–8621.
- Itoh Y, Matsuski M, Kida T, Akashi M (2006) Hydrogen-bonding layer-by-layer assembled biodegradable polymeric micelles as drug delivery vehicles from surfaces. *Biomacromolecules*, 7:2715–2718.
- Jessel N, et al. (2005) Short-time tuning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte. *Adv Funct Mater*, 15:648–654.
- Dierich A, et al. (2007) Bone formation induced by synergy-acting growth factors embedded in the multilayered film. *Adv Mater*, 19:693–697.
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK Transforming growth factor beta- biological function and chemical structure. *Science*, 233:532–534.
- Wozney JM, et al. (1988) Novel regulators of bone formation—molecular clones and activities. *Science*, 242:1528–1534.
- Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL (1997) Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem*, 67:386–396.
- Cheng YF, Corn RM (1999) Ultrathin polypeptide multilayer films for the fabrication of model liquid/liquid electrochemical interfaces. *J Phys Chem B*, 103:8726–8731.
- Boulmedais F, Schwinte P, Gergely C, Voegel JC, Schaaf P (2002) Secondary structure of polypeptide multilayer films: An example of locally ordered polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, 18:4523–4525.
- Yu AM, Wang YJ, Barlow E, Caruso F (2005) Mesoporous silica particles as templates for preparing enzyme-loaded biocompatible microcapsules. *Adv Mater*, 17:1737–1741.
- Donath E, Sukhorukov GB, Caruso F, Davis SA, M $\ddot{o}$ hwald H (1998) Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes. *Angew Chem Int Edit*, 37:2202–2205.
- Caruso F, Caruso RA, M $\ddot{o}$ hwald H (1998) Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science*, 282:1111–1114.
- Fischlechner M, Zschornig O, Hofmann J, Donath E (2005) Engineering virus functionalities on colloidal polyelectrolyte lipid composites. *Angew Chem Int Edit*, 44:2892–2895.
- Cortez C, et al. (2006) Targeting and uptake of multilayered particles to colorectal cancer cells. *Adv Mater*, 18:1998–2003.
- Zelikin AN, Li Q, Caruso F (2006) Degradable polyelectrolyte capsules filled with oligonucleotide sequences. *Angew Chem Int Edit*, 45:7743–7745.
- Johnston APR, Cortez C, Angelatos AS, Caruso F (2006) Layer-by-layer engineered capsules and their applications. *Curr Opin Colloid Int*, 11:203–209.
- De Rose R, et al. (2008) Binding, internalisation and antigen presentation of vaccine-loaded nanoengineered capsules in blood. *Adv Mater*, 20:4698–4703.
- Lavalle P, et al. (2002) Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules*, 35:4458–4465.
- Laub M, Jennissen P, Seul T, Schmachtenberg E (2001) Molecular modelling of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) by 3D-rapid prototyping. *Material Wiss und Werkst*, 32:926–930.
- Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR (1992) Crystal structure of transforming growth factor- $\beta$ 2: An unusual fold for the superfamily. *Science*, 257:369–373.
- Jukes Jojanne M, et al. (2008) Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:6840–6845.



### **II.3 Résultats et discussion**

En chirurgie traumatologique, les défauts osseux (ou comminution) localisés sont un problème au quotidien. Ils peuvent être d'origine tumorale (Liverneaux, 2003), ostéoporotique (sujets âgés) ou post-traumatiques (fractures) (Liverneaux, 2004). Il existe certes des méthodes de comblements osseux (SOFROT, 2011), mais il faut attendre le processus naturel de colonisation du substitut osseux, puis de minéralisation des ostéoblastes. L'apport de l'ingénierie tissulaire s'avère donc intéressant, afin de résoudre localement un défaut de régénération osseuse. Dans cette étude nous avons voulu développer un biomatériau à la fois capable d'induire du tissu osseux et d'être injecté par voie « mini-invasive » du fait de la taille de la capsule. Nos résultats suggèrent que la différenciation en lignée osseuse des cellules souches embryonnaires (EB) est possible en présence de nos capsules de multicouches de polyélectrolytes fonctionnalisées avec deux facteurs de croissance osseux.

La bonne construction des films de multicouches sous forme de capsules (autour d'une particule de noyau de silice) a été possible. Ensuite l'incorporation des facteurs de croissance entre 2 polyélectrolytes au sein du film de multicouches s'est avérée satisfaisante comme le laissait présager d'autres études avec incorporation de protéines dans les multicouches (Benkirane-Jessel *et al*, 2003) (Benkirane-Jessel *et al*, 2004). Les constructions de l'enveloppe externe des capsules ont été vérifiées et caractérisées avec succès par 2 méthodes : la technique de double polarisation interférométrique (DPI) et la visualisation des capsules par microscopie confocale. Après une construction physicochimique concluante, restait à savoir si ces capsules et si les facteurs de croissance incorporés, allaient avoir une activité biologique d'ostéoinduction. Pour le prouver, nous avons utilisé des corps embryonnaires (Loubet *et al*, 1998) mis au contact des capsules *in vitro*, puis *in vivo* et regardé s'il y avait induction de la formation osseuse.

Dans un premier temps, l'activité biologique des capsules fonctionnalisées a été testée *in vitro* sur des cellules souches embryonnaires. Les résultats sont satisfaisants, puisqu'une ostéoinduction est constatée. Une différenciation en lignée osseuse et une biominéralisation sont apparues. Tandis que dans le groupe témoin (capsules sans BMP-2 et TGF- $\beta_1$ ) aucune différenciation ou minéralisation n'a eu lieu, confortant bien l'hypothèse que se sont les facteurs de croissance osseux, qui sont responsables de l'action d'ostéoinduction sur les

cellules souches et qu'ils sont restés actifs *in vitro*, malgré l'incorporation dans le film. Les cellules souches se différencient sous l'influence du milieu de culture (Zur Nieden *et al*, 2003) (Trojani *et al*, 2008). BMP-2 et TGF- $\beta_1$  incorporés dans le film de multicouches induisent non seulement la différenciation cellulaire mais aussi l'expression de l'ostéopontine, la synthèse de collagène de type I et de cristaux d'hydroxyapatite, marqueurs d'une minéralisation correcte de la MEC et signe que les ostéoblastes obtenus sont actifs.

Dans un second temps, l'activité biologique des capsules fonctionnalisées a été testée *in vivo*, avec des cellules souches embryonnaires implantées dans du gel en position sous-cutanée sur des souris « nude ». Les résultats là aussi sont satisfaisants avec visualisation d'une différenciation en ostéoblastes et une biominéralisation de la MEC. Un second groupe témoin (capsules avec BMP-2 et TGF- $\beta_1$  mais implantées sans gel d'alginate) a été testé en parallèle. Il n'a été constaté aucune différenciation ou minéralisation des capsules fonctionnalisées dans ce groupe d'implantation sans gel. Nous avons aussi utilisé les propriétés du gel d'alginate comme matrice pour faciliter l'implantation et l'intégration des cellules. De plus, le gel d'alginate s'avère nécessaire comme matrice extra-cellulaire. L'incorporation des facteurs BMP-2 et TGF- $\beta_1$  au sein du film de multicouches n'altère pas leur action biologique d'ostéoinduction sur les cellules souches embryonnaires. Les facteurs restent actifs *in vivo* au sein de la multicouche de polyélectrolytes.

Au cours de l'expérimentation *in vitro*, nous avons pu induire temporairement des cellules de la lignée chondrocytaire autour du dixième jour de culture des EB en présence de nos capsules actives. Nous pouvons ainsi tenter de stopper cette différenciation à ce stade, à des fins de régénération du tissu cartilagineux ou de la région ostéochondrale. Dans ce cas et afin de stabiliser l'induction chondrogénique spécifique du cartilage, on peut envisager l'incorporation des siRNA ostéopontine et ostéocalcine, pour bloquer la minéralisation (Zhang *et al*, 2010). Nos deux expérimentations se sont portées vers la régénération osseuse pure : mais pourquoi ne pas appliquer la technique à la régénération cartilagineuse voire à une régénération mixte ostéoarticulaire, en bloquant certaines capsules au stade chondrocytaire et en laissant certaines capsules évoluer vers la lignée ostéoblastique ?

Plusieurs limites semblent exister dans cette étude et peuvent être discutées afin de poursuivre l'expérimentation. Nous avons utilisé des cellules souches embryonnaires : pourquoi ne pas utiliser des cellules souches mésenchymateuses ou des cellules

osseuses primaires directement ? Les problèmes de greffes spongieuses autologues sont bien connus (Trojani *et al*, 2008), entre la morbidité du prélèvement et la qualité de l'os prélevé atteint de la même maladie osseuse. Les cellules souches apparaissent donc comme une source d'os de meilleure qualité. Au lieu des cellules embryonnaires (non utilisables chez l'homme à l'heure actuelle pour des raisons éthiques), on pourrait envisager d'utiliser les cellules souches mésenchymateuses autologues adultes, obtenues soit à partir des adipocytes après liposuccion, soit de la moelle osseuse ou du plasma après centrifugation (Saw *et al*, 2011). Et on vérifierait l'effet de nos nanostructures *in vitro* puis *in vivo* selon le même protocole décrit. Il est clair qu'on ne peut en aucun cas extrapoler l'effet produit sur les cellules souches embryonnaires par nos capsules, à l'effet qui serait constaté sur les cellules souches mésenchymateuses autologues, n'oublions pas que dans le premier cas, elles sont totipotentes (Loubet *et al*, 1998), alors que dans le second cas elles sont multipotentes (Doetschmann *et al*, 1985) (Resnik *et al*, 1992).

Les résultats de cette seconde étude démontrent que nous sommes en mesure de proposer un biomatériau facile à produire, facile à injecter, biodégradable, bifonctionnalisé, ostéoinducteur *in vitro* comme *in vivo*. D'autres travaux avaient été réalisés avec des microgranules composites à partir de collagène et chitosane avec incorporation de TGF- $\beta$ 1 (Lee *et al*, 2006). Ces travaux avait aussi permis une régénération osseuse *in vitro* puis *in vivo*. La particularité de notre travail réside dans l'utilisation de capsules bifonctionnalisées et injectables, qui peuvent être utilisées localement dans le cas de défaut osseux pour une régénération tissulaire ciblée et localisée.

### **III - Fonctionnalisation de membranes nanofibreuses par des nanoréservoirs actifs (Publication n°3)**

**“ Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapics ”**

FACCA S, MENDOZA-PALOMARES C, FERRAND A, FIORETTI F, MAINARD D, BENKIRANE-JESSEL N. *ACS Nano*, 2011, 6, 483-90

### **III.1 Résumé du travail**

#### **Objectifs**

Avec l'augmentation de l'espérance de vie, l'incidence des pathologies touchant les personnes âgées augmentent, notamment la dégénérescence arthrosique au niveau des articulations (Levy *et al*, 1993). A l'heure actuelle, le traitement curatif de référence reste le remplacement arthroplastique. Mais l'évolution des nanobiotechnologies, a permis de voir l'émergence de biomatériaux qualifiés de « bioactifs » car fonctionnalisés, puis de dits « vivants », car contenant un contingent cellulaire. L'objectif de ce travail a été de créer un biomatériau, qui permette la réparation d'un défaut cartilagineux avec plusieurs caractéristiques spécifiques. Première caractéristique, le biomatériau doit être résorbable et de petite taille pour permettre une implantation de type « mini-invasive » et réduire le temps de convalescence post-opératoire. Seconde caractéristique, le biomatériau doit être fonctionnalisé par des facteurs de croissance pour favoriser la prolifération cellulaire. Dernière caractéristique, le biomatériau doit être capable de régénérer le complexe os-cartilage *id est* le tissu cartilagineux mais aussi son sous-sol : l'os sous-chondral.

#### **Méthodes**

Pour répondre à ces 3 caractéristiques, nous avons en premier lieu fabriqué une membrane par électro-filage (ou *electrospinning*), technique approuvée par la FDA (Kenawy *et al*, 2003). Ces membranes résorbables sont constituées de nanofibres (d'environ 500 nm de diamètre) d'un polymère le PCL (Poly  $\epsilon$ -CaproLactone). En second lieu, ces membranes ont été nanofonctionnalisées par des facteurs de croissance (la BMP-2) sous forme de nanoréservoirs enfouis dans le film de multicouches par simple immersion alternant BMP-2 et un polycation le DGL (Dendigraft poly(L-lysine). Enfin, ces membranes nanostructurées ont été rendues « vivantes » par adjonction de cellules de type ostéoblastes ou chondrocytes primaires. Ces membranes fonctionnalisées ou pas, ont testées *in vitro* avec des ostéoblastes en culture, afin de vérifier leur capacité d'ostéoinduction. Puis elles ont été implantées chez des souris « nude » *in vivo* en sous-cutanée et sur des défauts osseux crâniens (*calvaria*). Les explants ont été analysés après 1 et 2 mois par plusieurs techniques, en immunofluorescence, en microscopie électronique, en microspectroscopie confocale, en histologie et en

nanoidentation, pour confirmer leurs propriétés d'induction d'os ou d'une unité os sous-chondral-cartilage en fonction du contingent cellulaire ajouté.

## Résultats principaux

L'architecture de nos membranes nanofibreuses est une architecture fibrillaire 3D, qui mime et reproduit celle d'une matrice et qui permet ainsi aux cellules de se retrouver dans des conditions physiologiques. L'incorporation de principes actifs a été suivie par la technique de « microbalance à quartz » (QCM-D). Cette technique a permis de voir l'adsorption progressive de la BMP-2 dans le film de multicouches : réalisant ainsi des nanoréservoirs de facteurs de croissance, qui vont être libérés progressivement avec la dégradation des multicouches de DGL. L'analyse des membranes avec nanoréservoirs, testées *in vitro* avec des ostéoblastes humains, retrouve une augmentation de l'expression génique des protéines de type ostéocalcine, *bone sialoprotéine* et ostéopontine par rapport aux membranes contrôle sans nanoréservoirs. A 21 jours, les membranes avec nanoréservoirs ont induit une minéralisation de la matrice extra-cellulaire. L'analyse *in vivo* confirme ces résultats d'ostéoinduction, lorsque que les membranes ont été implantées avec des ostéoblastes. Ces membranes implantées avec en plus un contingent chondrocytaire ont aussi une capacité d'induction d'une unité os-cartilage.

## Conclusions du travail

Durant ce travail, nous avons démontré que ces membranes nanofibreuses, ainsi fonctionnalisées par des nanoréservoirs de BMP-2, se sont avérées biocompatibles. Ces implants sont capables *in vitro* comme *in vivo* d'une régénération osseuse et cartilagineuse. Ils sont intéressants par leur petite taille permettant une implantation « mini-invasive », par leur propriété de biorésorption, par leur activité biologique (relargage progressif de facteurs de croissance, la BMP-2 étant protégée dans ses nanoréservoirs). L'importance de ce travail réside dans la régénération de l'os sous-chondral en induisant la formation de l'unité os-cartilage. Il en découle un intérêt dans la prise en charge des défauts cartilagineux post-traumatiques ou post-arthrosiques.

**Mots clés :** nanofibres, membranes, nanoréservoirs, os sous-chondral, régénération ostéoarticulaire.

# Smart Hybrid Materials Equipped by Nanoreservoirs of Therapeutics

Carlos Mendoza-Palomares,<sup>†,\*,#</sup> Alice Ferrand,<sup>†,5,#</sup> Sybille Facca,<sup>†,\*</sup> Florence Fioretti,<sup>†,\*,#</sup> Guy Ladam,<sup>1,†</sup> Sabine Kuchler-Bopp,<sup>†,†</sup> Thomas Regnier,<sup>†</sup> Didier Mainard,<sup>∇</sup> and Nadia Benkirane-Jessel<sup>†,∇,\*</sup>

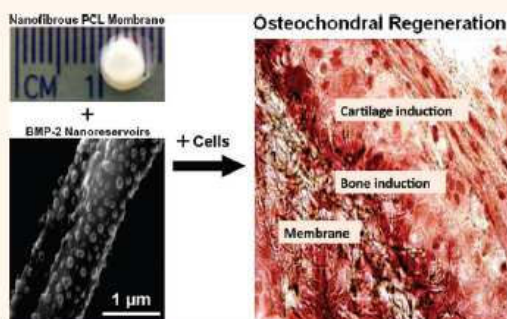
<sup>†</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 977, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France, <sup>‡</sup>Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France, <sup>§</sup>LIPHT (UMR 7165 CNRS), ECPM, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France, <sup>¶</sup>La2B (Laboratoire de Biophysique et Biomatériaux), EA 3233, Université de Rouen, Centre Universitaire d'Evreux, 1 rue du 7ème Chasseurs, 27002 Evreux, France, <sup>¶¶</sup>IBMM (UMR 5247 CNRS), Université Montpellier 1&2, Cap Alpha, avenue de l'Europe, Clapiers, 34940 Montpellier, France, and <sup>∇</sup>Hôpital Central, Service de Chirurgie Orthopédique and UMR 7561 CNRS, 29 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 54035 Nancy, France \*These authors equally contributed to this work.

Smart nanoengineered materials allow novel therapeutic modalities such as improved specific cell targeting by means of nanoparticle-based drugs, resulting in decreased side effects for patients. 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 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 tissues and organs regeneration scaffolds. 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. The guidance provided by biomaterials may facilitate restoration of structure and function of damaged or dysfunctional tissues. Such materials should provide provisional 3-D support to interact with cells in ways that control their function, by guiding the spatially and temporally complex multicellular processes of tissue formation and regeneration.<sup>1–9</sup>

Our expected outcomes are the development of clinical applications in the field of tissue engineering and nanomedicine, and more particularly in bone and cartilage regeneration. Recently, our group has focused on the development of nanostructured active

## ABSTRACT



Nanobiotechnology enables the emergence of entirely new classes of bioactive devices intended for targeted intracellular delivery for more efficacies and less toxicities. Among organic and inorganic approaches currently developed, controlled release from polymer matrices promises utmost clinical impact. Here, a unique nanotechnology strategy is used to entrap, protect, and stabilize therapeutic agents into polymer coatings acting as nanoreservoirs enrobing nanofibers of implantable membranes. Upon contact with cells, therapeutic agents become available through enzymatic degradation of the nanoreservoirs. As cells grow, divide, and infiltrate deeper into the porous membrane, they trigger slow and progressive release of therapeutic agents that, in turn, stimulate further cell proliferation. This constitutes the first instance of a smart living nanostructured hybrid membrane for regenerative medicine. The cell contact-dependent bioerodable nanoreservoirs described here will permit sustained release of drugs, genes, growth factors, etc., opening a general route to the design of sophisticated cell-therapy implants capable of robust and durable regeneration of a broad variety of tissues.

**KEYWORDS:** biomineralization · biomaterials · osteochondral regeneration · drug delivery · nanostructured coatings · nanoreservoirs of active molecules

biomaterials within this field. With the aging of the population and a correlated increase in the incidence of osteo-articular damage, great attention is focused on tissue engineering solutions to restore durable articular function and comfort. This is considered a highly accessible first target for regenerative medicine due to the nature of tissues concerned. Current methods aim at repairing

\* Address correspondence to nadia.jessel@inserm.fr.

Received for review October 5, 2011 and accepted December 17, 2011.

Published online 10.1021/nn203817t

©XXXX American Chemical Society



full-thickness cartilage defects.<sup>10,11</sup> These limited techniques are generally not sufficient to ensure durable cartilage repair, and it is becoming apparent that without a healthy subchondral bed, the entire osteochondral unit is likely to fail. Therefore, the future of articular cartilage repair depends on the development of advanced implants allowing entire osteochondral unit replacement, not only bone or cartilage regeneration as addressed until now. We report here the first demonstration of bone and cartilage regeneration by implementing a novel strategy based on a synthetic nanoengineered biomimicking membrane functionalized with nanoreservoirs of a growth factor (bone morphogenetic protein 2, BMP-2).

Several biomimicking medical devices for regenerative medicine have been inspired from the intricate fibrillar architecture of natural extra-cellular matrix (ECM) components. Such matrices have already shown remarkable success in tissue engineering applications, such as reconstruction of a dog urinary bladder,<sup>12</sup> or regeneration after brain injury in a mouse stroke model.<sup>13</sup> However, it is established that inert ECM mimetic scaffolds are not efficient to generate durable tissue repair. 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 and active biomaterials incorporating drugs, genes, or growth factors within the form of coatings.<sup>14–28</sup>

To date, three polymer processing technologies (self-assembly, phase separation, electrospinning) allow the fabrication of nanofibrous scaffolds.<sup>29–32</sup> Electrospinning allows fiber formation down to the 10-nm scale.<sup>33</sup> Our strategy for regenerating the osteochondral unit combines a synthetic electrospun nanofibrous membrane (ENM) comprising the FDA-approved poly( $\epsilon$ -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.<sup>7,15–24</sup> This is the first investigation of combined biodegradable PCL and active molecules for regenerative medicine.

The European and American authorities have already approved the use of BMP-2 for bone regeneration applications. For example, Medtronic offers InductOS which is a basic collagen matrix (of animal origin) soaked in BMP-2 (12 mg). 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 or subchondral 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. This strategy aims at a dramatic enhancement of therapeutic efficacy at reduced cost.

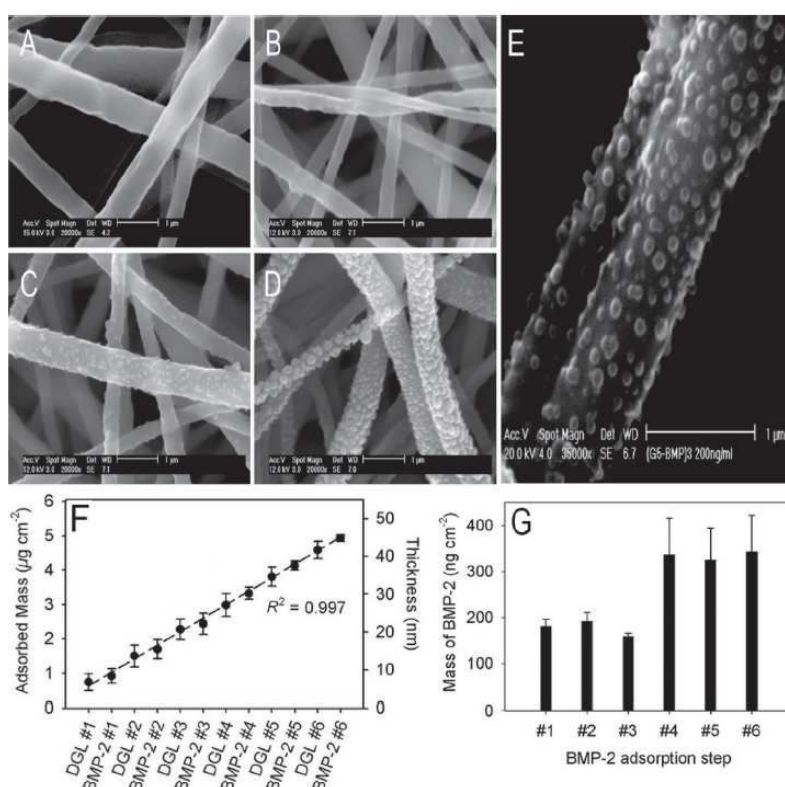
## RESULTS AND DISCUSSION

From the nanostructured organization surrounding the nanofibers, we can observe the effective step-by-step buildup of the active nanoreservoirs achieved by simple alternate immersions into a polycation (dendri-graft poly(L-lysine), DGL) solution and the therapeutic agent (BMP-2) solution (Figures 1A–E). The buildup of the nanoreservoirs embedding BMP-2 was followed by quartz crystal microbalance (QCM-D), revealing linear growth in the wet adsorbed mass and the hydrodynamic thickness, and confirming the nanometric scale of the nanoreservoirs (Figure 1F). Each BMP-2 injection step resulted in the immobilization of about  $180 \text{ ng cm}^{-2}$  BMP-2 up to the NR<sub>3</sub> architecture, and about  $330 \text{ ng cm}^{-2}$  for further steps (Figure 1G). This difference is not unexpected considering that a few adsorption steps are generally required to overcome the possible influence of the underlying substrate and, in turn, to reach a steady layer-by-layer growth regime.<sup>35</sup> We additionally showed the versatility of the deposition method by applying it successfully to that already used in the clinic BioGide collagen membranes (Geistlich) (Figure 2).

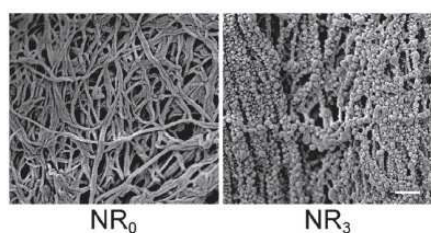
The capacity of nanoreservoirs to induce *in vitro* specific gene expression by human osteoblasts was verified by immunochemistry after 7 days of culture (Figure 3A). Treated ENM membranes enhanced the proliferation of human osteoblasts *in vitro* (Figure 3B), while specific gene expression after 7-day culture was fostered by NR<sub>3</sub> architectures: 43.7 ( $\pm 8.8$ )-fold higher osteocalcin gene expression compared to cells grown onto nonfunctionalized NR<sub>0</sub> membranes (Figure 3C), 135.3 ( $\pm 27.5$ )-fold higher bone sialoprotein (Bspil) gene expression (major structural protein of bone matrix), and 186.2 ( $\pm 50.1$ )-fold higher osteopontin gene expression. For tissue engineering application, we tested these nanostructured membranes as platforms to differentiate stem cells and generate active tissue. To this end, treated ENM membranes were seeded with embryonic stem cells and their potentiality to induce bone formation *in vivo* was confirmed by the expression of osteopontin after 30 days of implantation in mice (Figure 3D).

To analyze more deeply the capacity of these membranes to induce bone mineralization, an ENM NR<sub>3</sub> membrane was inspected by confocal Raman microspectroscopy after 21-day *in vitro* mineralization by human osteoblasts, to detect calcium phosphate (CaP) deposition. A nonmineralized ENM NR<sub>3</sub> membrane was analyzed as a reference. Raman signatures are very similar (Figure 4A), except in the region around  $960 \text{ cm}^{-1}$  relative to CaP, where the signatures of the





**Figure 1.** (A–D) SEM images ( $\times 20,000$ ) of ENM membranes showing the layer-by-layer deposition of NR<sub>n</sub> nanoreservoirs incorporating BMP-2. (A) NR<sub>0</sub>; (B) NR<sub>1</sub>; (C) NR<sub>3</sub>; (D) NR<sub>6</sub>. (E) Zoomed SEM image of C ( $\times 35,000$ ). Scale bars: 1  $\mu\text{m}$ . (F) Evolution of the mean wet mass and hydrodynamic thickness during the buildup of NR<sub>6</sub> nanoarchitectures onto gold-coated quartz sensors followed by quartz crystal microbalance (QCM-D). The normalized frequency curves ( $\Delta f_n/n$ ) of the different overtones were almost superimposed (data not shown), meaning that the deposits were rigid enough to allow the application of the Sauerbrey relation.<sup>34,35</sup> Mass and thickness values were derived from the 3rd overtone frequency changes. Error bars represent the standard errors over two distinct experiments. The dotted line represents the linear regression fit accompanied by the corresponding determination coefficient  $R^2$ . (G) Mean wet mass increments upon successive BMP-2 deposition steps derived from the data shown in panel F.

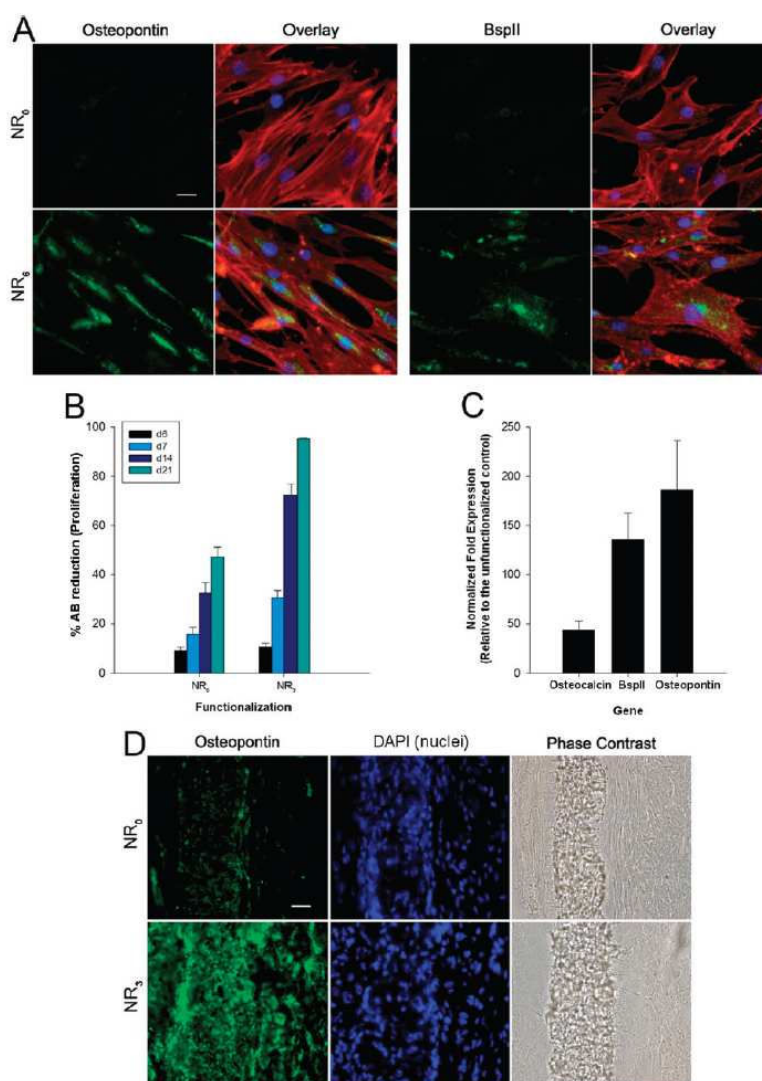


**Figure 2.** SEM visualization of the collagen membrane already used in the clinic (BioGide, Geistlich) before and after BMP-2 nanoreservoirs formation. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .

mineralized membrane show a significant peak proving the presence of CaP, contrary to the unmineralized membrane. Raman signatures of the latter display a weak peak at 963  $\text{cm}^{-1}$  relative to PCL, whose contribution to the CaP peak on mineralized membranes is negligible.<sup>36</sup> A 2-D mapping of the CaP peak intensity over the mineralized membrane (Figure 4B), reveals a massive CaP deposition all over the ENM NR<sub>3</sub> membrane. The peaks at 960  $\text{cm}^{-1}$  and 430  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 4A) reveal the presence of hydroxyapatite (HAp) and/or

octacalcium phosphate (OCP), while the peak at 1005  $\text{cm}^{-1}$  is unambiguously attributable to OCP.<sup>37,38</sup> If the coating was pure OCP, a shoulder should be present at 966–970  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>37,38</sup> The absence of such a feature is 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 precursor phase of HAp in bone.<sup>38</sup>

The set of results described above is highly promising in view of bone induction, and points to potentially far more efficient surgical approaches than are currently available. To this end, we propose an ENM-based medical device (Implant Type 1 “NanoM1”) for small lesions of bone without the need of osteoblasts from patients (Figure 5). In addition, we propose an Implant Type 2 (“NanoM1C”), consisting of a NanoM1 device supplemented with cells (osteoblasts and/or chondrocytes) from the patients (Figure 6), in order to address larger bone and/or cartilage lesions. We have the final products ready to use for preclinical trials, for bone regeneration in maxillofacial and orthopedic



**Figure 3.** (A) Osteopontin and Bsp11 expression in human osteoblasts after 7 days of culture onto pristine ENM NR<sub>0</sub> and ENM NR<sub>3</sub> membranes. Green, osteopontin and Bsp11 expression; red, phalloidin staining for actin cytoskeleton; blue, DAPI staining for the nucleus. Scale bar: 20  $\mu$ m. (B) *In vitro* proliferation of human osteoblasts growing on the surface of ENM NR<sub>3</sub> membranes. (C) Differences in gene expression monitored by qPCR of bone markers in human osteoblasts after 7 days of culture onto ENM NR<sub>3</sub> membranes as compared with nonfunctionalized ENM NR<sub>0</sub> membranes. (D) *In vivo* osteopontin expression on ENM NR<sub>3</sub> membranes seeded by stem cells prior to implantation into nude mice for 30 days. Scale bar: 20  $\mu$ m.

fields, and for osteochondral repair (bone-cartilage unit regeneration), respectively. All implants were used *in vivo* (mouse model), and were found to promote bone and/or cartilage regeneration. Our results clearly indicate colonization of ENM membranes by osteoblasts, as well as mineralization and cartilage regeneration (Figure 6R).

After 2 months of implantation on nude mice (males, 16 week-old), nanomechanical analysis of the retrieved implants showed an increased elastic modulus ( $2.19 \pm 0.39$  GPa) for the Implant Type 1 NanoM1 device in comparison with the ENM NR<sub>0</sub> membrane ( $1.74 \pm 0.65$  GPa), which is likely due to the effect of the incorporated BMP-2. Promisingly, the highest value of elastic modulus was measured for an Implant

Type 2 membrane enriched with hOsteoblasts ( $14.26 \pm 2.16$  GPa).

The treatment goal for large chondral or osteochondral defects should be to restore the physiological properties of the entire osteochondral unit, aiming to achieve a more predictable repair tissue that closely resembles the native articular surface and remains durable over time. We report here the first demonstration of subchondral bone regeneration using a strategy based on a synthetic nanoengineered electrospun membrane manufactured using an FDA-approved polymer and functionalized with nanoreservoirs of a growth factor (BMP-2). At this step, our results show that we can (i) design an ENM implant controlled in size and thickness, enriched in BMP-2 (Implant Type 1) and,



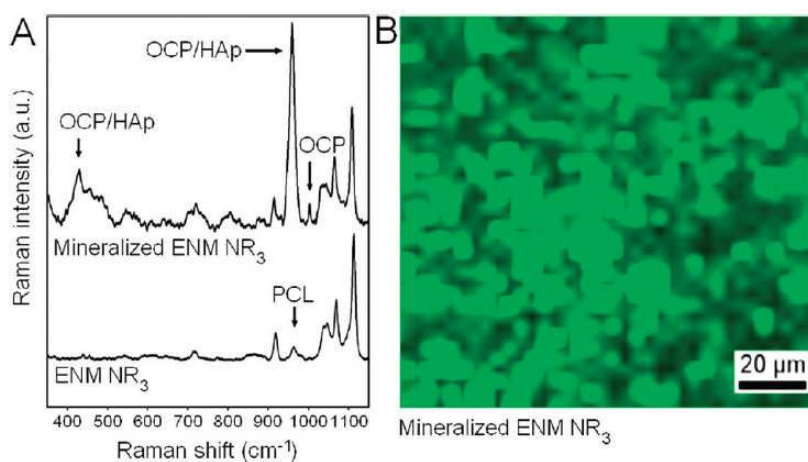


Figure 4. (A) Typical Raman spectra of (down) a native and (up) a mineralized ENM NR<sub>3</sub> membrane (HAp, hydroxyapatite; OCP, octacalcium phosphate). Mineralization was performed by 21-day incubation of the membrane with human osteoblasts in adequate medium. The spectra are offset for sake of clarity. (B) 2-D mapping of the calcium phosphate peak over the mineralized membrane (100 × 100 μm<sup>2</sup>; meshsize 2.8 μm).

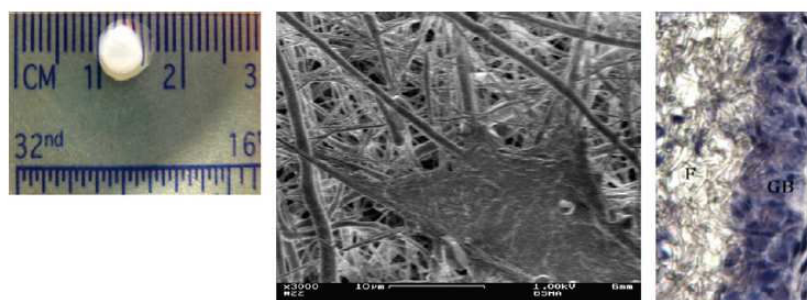


Figure 5. (Left) Implant Type 1 (NanoM1:PCL ENM NR<sub>3</sub>). ENM membranes of different sizes and thicknesses can be produced. (Middle) Morphology of osteoblasts on NanoM1 implant after 1 day. Cells are well spread and migrate along nanofibers. (Right) Hematoxylin Eosin staining showing the membrane fibers (F) and generated bone (GB) after implantation of the proposed medical device NanoM1 (*in vivo* in nude mice).

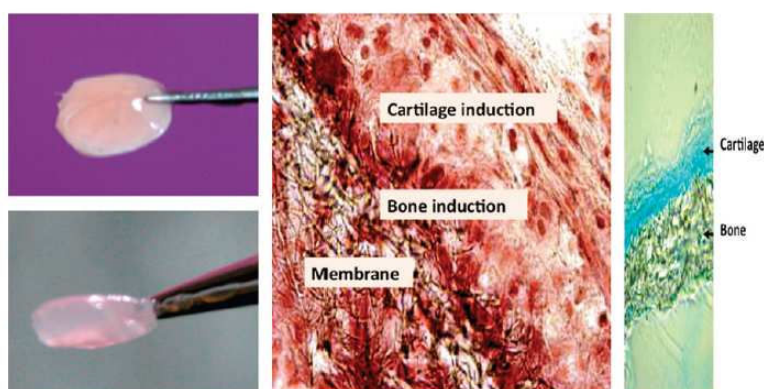


Figure 6. (Left) Implant Type 2 based on the Implant Type 1 supplemented with osteoblasts and chondrocytes from patients for bone-cartilage unit regeneration. (Middle and Right) Osteochondral unit regeneration by Implant Type 2 with osteoblast and chondrocytes as observed after 2 months of implantation into nude mice (right, proteoglycans secreted by chondrocytes were stained with Alcian blue for cartilage induction).

(ii) induce bone formation *in vitro* and *in vivo*. This membrane implant could be used for small lesions of bone without any need to add cells from patients. For large and deep lesions it becomes necessary to seed the

implant with osteoblasts from the patient. In the clinic today, surgeons use collagen membranes of animal origin that slowly induce bone formation, but cannot be used for all types of lesion. In this study, we have

deposited human osteoblasts and chondrocytes on the membrane (Implant Type 1) to fabricate a nanostructured active living membrane (Implant Type 2 = Implant Type 1 + osteoblasts + chondrocytes) and have shown bone and cartilage induction. We have also shown that active membranes (enriched in BMP-2) seeded with embryonic stem cells could induce bone regeneration (Figure 3D).

## CONCLUSIONS

The innovative medical device described here fulfills and exceeds the criteria for a BMP-2-loaded combination implant; BMP-2 from the nanoreservoirs becomes available in a reliable and sustained cell contact-dependent manner. 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 and the protection of BMP-2. The nanostructured membrane is produced using a special coating process that entraps the growth factor into nanoreservoirs atop the membrane fibers.

## METHODS

**Chemicals.** Poly( $\epsilon$ -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-lysine) (DGL) was purchased from Colcom (Montpellier, France). In this study, we have used the fifth-generation DGL<sup>55</sup>. Human recombinant BMP-2 was purchased from PeproTech. Sodium alginate medium viscosity was from Sigma, and hyaluronic acid (MW 132,300) was from Lifecore. Rat-tail type I collagen was purchased from Institut de Biotechnologies Jacques Boy.

**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<sup>-1</sup>, 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 × 20 cm<sup>2</sup>), connected to the ground at a distance from the needle of 17 cm, were used to collect the electrospun PCL scaffold.

**SEM Observation.** For morphological study, the PCL 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. Cells interactions with electrospun membranes were analyzed by SEM. Cell-seeded samples were fixed with 3% glutaraldehyde for 30 min at 4 °C, gently washed 3 times with PBS, gradually dehydrated with 20%, 40%, 80%, and 100% ethanol each for 5 min, covered with hexamethyldisilazane (HMDS), and finally left to dry overnight in a fumehood. 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.

**Buildup of the Nanoreservoirs (NR).** For all biological activity experiments, nanoreservoirs (NR) constituted by (DGL<sup>55</sup>/BMP-2)<sub>n</sub> layer-by-layer (LbL) architectures were built up onto electrospun PCL membranes by alternating immersion during 15 min in the adequate solutions (300  $\mu$ L) at the respective concentrations of 50  $\mu$ M for DGL<sup>55</sup> and 200 nM of BMP-2 in the presence of

Recently, we have elucidated the mechanism by which cells come in contact and interact with such a nanostructured coating.<sup>18,21,24,25</sup> Encapsulated by polymers, BMP-2 is protected and stabilized. Once cells come into contact with nanoreservoirs, cellular enzymes degrade their 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, stimulates further proliferation of the cells. This strategy should allow the fabrication of a combination cell-therapy implant capable of robust and durable cartilage repair in large defects. We mention that the possibility to continue the buildup of nanoreservoirs beyond the NR<sub>3</sub> architecture (Figure 1F,G), illustrates the robustness and the versatility of the method: if required by given applications, the method will allow to tune the biological activity or kinetics of action of the implants by varying the NR<sub>n</sub> architecture. 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.

0.04 M MES and 0.15 M NaCl at pH 5.5. After each deposition step the membranes were rinsed during 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.

**Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D).** QCM-D was operated with a D300 system (Q-Sense, Sweden) using a QAF302 flow chamber and Q5X301 gold-coated quartz crystal sensors. This technique consists of measuring the resonance frequency shifts  $\Delta f_n$  and the dissipation factor changes  $\Delta D_n$  of the quartz crystal sensor upon material deposition, for the fundamental ( $n = 1$ ), third ( $n = 3$ ), fifth ( $n = 5$ ), and seventh ( $n = 7$ ) overtones.<sup>39</sup> The LbL buildup was performed by successive 5-min injections of DGL<sup>55</sup> (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and BMP-2 (200 ng mL<sup>-1</sup>) solutions and rinsing solution (0.04 M MES, 0.15 M NaCl, pH 5.5) through the flow chamber, and monitored *in situ*. A shift  $\Delta f_n$  can be associated, in a first approximation, to the adsorbed mass through the Sauerbrey relation:<sup>34</sup>  $m = -C \times \Delta f_n/n$ , where  $C$  is a constant characteristic of the crystal used ( $C = 17.7$  ng cm<sup>-2</sup> Hz<sup>-1</sup>). Thicknesses were derived from mass values assuming a film density of 1.1 g cm<sup>-3</sup>.<sup>35</sup>

**Cells Culture.** Human primary osteoblasts were obtained from Cell Applications and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) containing 50 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptomycin, 2.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Amphotericin B, and 10% FBS (Life Technologies, Paisley, UK). Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. When cells reached subconfluence, they were harvested with trypsin and subcultured.

**Confocal Raman Microspectroscopy.** Two PCL electrospun membranes were coated with NR<sub>3</sub> nanoreservoirs. One membrane was stored in the buildup medium, while the other was seeded with human osteoblasts and incubated for 21 days in mineralization medium, then fixed with 4% PFA for 2 h, rinsed with PBS, and finally stored in water. The same mineralization treatment was applied to a native membrane as a reference. The membranes were laid upon a glass substrate and dried under a gentle flow of argon prior to analysis by confocal Raman microspectroscopy. 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 lines  $\text{mm}^{-1}$  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  $\times 50$ WD microscope objective. A confocal pinhole of 400  $\mu\text{m}$  diameter placed before the entrance slit was used to reject the Raman signal from out-of-focus planes. Raman spectra with good signal-to-noise ratios were recorded with an integration time of 60 s for single spectra and 15 s for 2-D mappings.

**Implants Preparation.** A sample portion of  $5 \times 10^4$  human osteoblasts was 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  $2 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . A 0.5 mL portion of the cells suspension was laid on the electrospun membrane and incubated at 37 °C. After 30 min, 0.5 mL of a human chondrocyte suspension ( $1 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) in an alginate/hyaluronic acid solution (4:1) prepared in 0.15 M NaCl, pH 7.4 were added in order to obtain the 3-layered construct. Cylinders of 5 or 2 mm were cut using a sterile biopsy punch and incubated *in vivo* at 37 °C in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  prior to *in vivo* experiments (subcutaneous or calvaria).

**Cell Proliferation.** AlamarBlue (Serotec) was used to assess cellular proliferation. The Alamar Blue test is a nontoxic, water-soluble, colorimetric redox indicator that changes color in response to cell metabolism. In this study,  $2 \times 10^4$  human osteoblasts were seeded on top of LbL-coated 14 mm-diameter membranes ( $n = 3$ ) placed on 24-well plates. After 6, 7, 14, or 21 days of culture, cells were incubated in 10% AlamarBlue/DMEM solution in a humidified atmosphere at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$ . After 4 h, 100 mL of incubation media was transferred to 96-well plates and measured at 590 and 630 nm in order to determine the percentage of AlamarBlue reduction.

**In Vivo Implantation on Skull of NMRI-Nude Mice.** The surgical procedure involved removal of the hair over the head *via* shaving and cleaning. 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 were performed using an electrical drill with a sterile round bur under irrigation of sterile normal saline before deposition of the two same membranes and sutures with Ethicon 9/0. The skin was closed with sutures and the animal's behavior observed after waking up.

**Nanoindentation.** Elastic modulus and hardness of bones and different membranes in the retrieved implants were 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. 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 of 100 nm at the loading/unloading rate of  $10 \text{ nm s}^{-1}$ . A dwell of 3 s was included at the maximum displacement. A total of 10–15 indents were performed on each sample. The Oliver and Pharr method was used to compute the elastic modulus.<sup>40</sup>

**Immunofluorescence.** Cells were fixed with 4% PFA over 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).

**Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).** CLSM observations were documented with a Zeiss LSM 510 microscope using a  $\times 40/1.4$  oil immersion objective at 0.4  $\mu\text{m}$  z-section intervals. FITC fluorescence was detected after excitation at 488 nm with a cutoff dichroic mirror 488 nm and an emission band-pass filter 505–530 nm (green).

**Statistical Analysis.** All values are expressed as mean  $\pm$  SEM, and all experiments were repeated at least three times. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test. A probability  $p$  value  $< 0.05$  was considered significant to reject the null hypothesis.

**Acknowledgment.** This work was supported by AAP 2011 “Maturation de projets innovants” Conectus and “Alsace contre le Cancer”. C.M. thanks the Faculté de Chirurgie Dentaire 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). G.L. thanks the “Communauté d'Agglomération d'Évreux” and the “Conseil Général de l'Eure” for partial financial support of La2B. N.J. is also indebted to Antony Rutt (starting team member of our Start Up project “ARTIOS NanoMed”) for his help.

## REFERENCES AND NOTES

- Peppas, N. A.; Langer, R. New Challenges in Biomaterials. *Science* **1994**, *263*, 1715–1720.
- Hubbell, J. A. Biomaterials in Tissue Engineering. *Biotechnology* **1995**, *13*, 565–576.
- Langer, R.; Tirrell, D. A. Designing Materials for Biology and Medicine. *Nature* **2004**, *428*, 487–492.
- Yang, C.; Hillas, P. J.; Báez, J. A.; Nokelainen, M.; Balan, J.; Tang, J.; Spiro, R.; Polarek, J. W. The Application of Recombinant Human Collagen in Tissue Engineering. *BioDrugs* **2004**, *18*, 103–119.
- Griffith, L. G.; Naughton, G. Tissue Engineering—Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science* **2002**, *295*, 1009–1014.
- Dvir, T.; Tinko, B. P.; Kohane, D. S.; Langer, R. Nanotechnological Strategies for Engineering Complex Tissues. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 13–22.
- Tang, Z.; Wang, Y.; Podsiadlo, P.; Kotov, N. A. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 3203–3224.
- Cuddihy, M. J.; Kotov, N. A. Poly(Lactic-co-glycolic acid) Bone Scaffolds with Inverted Colloidal Crystal Geometry. *Tissue Eng. Part A*. **2008**, *14*, 1639–1649.
- Lee, J.; Cuddihy, M. J.; Kotov, N. A. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2008**, *14*, 61–86.
- Gomoll, A. H.; Madry, H.; Knutsen, G.; van Dijk, N.; Seil, R.; Brittberg, M.; Kon, E. The Subchondral Bone in Articular Cartilage Repair: Current Problems in the Surgical Management. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2010**, *18*, 434–447.
- Kreuz, P. C.; Steinwachs, M. R.; Erggelet, C.; Krause, S. J.; Konrad, G.; Uhl, M.; Südkamp, N. Results after Microfracture of Full-Thickness Chondral Defects in Different Compartments in the Knee. *Osteoarthritis Cartilage* **2006**, *14*, 1119–1125.
- Oberpenning, F.; Meng, J.; Yoo, J. J.; Atala, A. *De Novo* Reconstitution of a Functional Mammalian Urinary Bladder by Tissue Engineering. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 149–155.
- Park, K. I.; Teng, Y. D.; Snyder, E. Y. The Injured Brain Interacts Reciprocally with Neural Stem Cells Supported by Scaffolds to Reconstitute Lost Tissue. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1111–1117.
- Zhang, S. Fabrication of Novel Biomaterials through Molecular Self-Assembly. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1171–1178.
- Lynn, D. M. Layers of Opportunity: Nanostructured Polymer Assemblies for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Soft Matter* **2006**, *2*, 269–273.
- Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.
- Jessel, N.; Atalar, F.; Lavalle, P.; Mutterer, J.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Ogier, J. Bioactive Coatings Based on a Polyelectrolyte Multilayer Architecture Functionalized by Embedded Proteins. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 692–695.
- Benkirane-Jessel, N.; Lavalle, P.; Meyer, F.; Audouin, F.; Frisch, B.; Schaaf, P.; Ogier, J.; Decher, G.; Voegel, J. C.

- Control of Monocyte Morphology on and Response to Model Surfaces for Implants Equipped with Anti-inflammatory Agents. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1507–1514.
19. Benkirane-Jessel, N.; Schwinté, P.; Falvey, P.; Darcy, R.; Haïkel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Ogier, J. Buildup of Polypeptide Multilayer Coatings with Anti-inflammatory Properties Based on the Embedding of Piroxicam–Cyclodextrin Complexes. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 174–182.
  20. Jessel, N.; Oulad-Abdelghani, M.; Meyer, F.; Lavalle, P.; Haïkel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C. Multiple and Time-Scheduled *in Situ* DNA Delivery Mediated by Beta-Cyclodextrin Embedded in a Polyelectrolyte Multilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8618–8621.
  21. Kim, B. S.; Park, S. W.; Hammond, P. T. Hydrogen-Bonding Layer-by-Layer-Assembled Biodegradable Polymeric Micelles as Drug Delivery Vehicles from Surfaces. *ACS Nano* **2008**, *2*, 386–392.
  22. Benkirane-Jessel, N.; Lavalle, P.; Hübsch, E.; Holl, V.; Senger, B.; Haïkel, Y.; Voegel, J. C.; Ogier, J.; Schaaf, P. Short-Time Tuning of the Biological Activity of Functionalized Polyelectrolyte Multilayers. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 648–654.
  23. Dierich, A.; Le Guen, E.; Messaddeq, N.; Stoltz, J. F.; Netter, P.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Benkirane-Jessel, N. Bone Formation Mediated by Synergy-Acting Growth Factors Embedded in a Polyelectrolyte Multilayer Film. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 693–697.
  24. Facca, S.; Cortez, C.; Mendoza-Palomares, C.; Messaddeq, N.; Dierich, A.; Johnston, A. P. R.; Mainard, D.; Voegel, J. C.; Caruso, F.; Benkirane-Jessel, N. Active Multilayered Capsules for *in Vivo* Bone Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 3406–3411.
  25. Krogman, K. C.; Lowery, J. L.; Zacharia, N. S.; Rutledge, G. C.; Hammond, P. T. Spraying Asymmetry into Functional Membranes Layer-by-Layer. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 512–518.
  26. Ding, B.; Kim, J.; Kimura, E.; Shiratori, S. Layer-by-Layer Structured Films of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles and Poly(acrylic acid) on Electrospun Nanofibres. *Nanotechnology* **2004**, *15*, 913–917.
  27. Müller, K.; Quinn, J. F.; Johnston, A. P. R.; Becker, M.; Greiner, A.; Caruso, F. Polyelectrolyte Functionalization of Electrospun Fibers. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 2397–2403.
  28. Ogawa, T.; Ding, B.; Sone, Y.; Shiratori, S. Super-Hydrophobic Surfaces of Layer-by-Layer Structured Film-Coated Electrospun Nanofibrous Membranes. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 165607.
  29. Lee, J. A.; Krogman, K. C.; Ma, M.; Hill, R. M.; Hammond, P. T.; Rutledge, G. C. Highly Reactive Multilayer-Assembled TiO<sub>2</sub> Coating on Electrospun Polymer Nanofibers. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1252–1256.
  30. Barnes, C. P.; Sell, S. A.; Boland, E. D.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. Nanofiber Technology: Designing the Next Generation of Tissue Engineering Scaffolds. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 1413–1433.
  31. Yoo, H. S.; Kim, T. G.; Park, T. G. Surface-Functionalized Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 1033–1042.
  32. Fioretti, F.; Mendoza-Palomares, C.; Helms, M.; Al Alam, D.; Richert, L.; Arntz, Y.; Rinckenbach, S.; Garnier, F.; Haïkel, Y.; Gangloff, S. C.; Benkirane-Jessel, N. Nanostructured Assemblies for Dental Application. *ACS Nano* **2010**, *22*, 3277–3287.
  33. Kenawy, E. R.; Layman, J. M.; Watkins, J. R.; Bowlin, G. L.; Matthews, J. A.; Simpson, D. G.; Wnek, G. E. Electrospinning of Poly(ethylene-co-vinyl alcohol) Fibers. *Biomaterials* **2003**, *24*, 907–913.
  34. Sauerbrey, G. Use of Vibrating Quartz for Thin Film Weighing and Microweighing. *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206–222.
  35. Abdelkebir, K.; Gaudière, F.; Morin-Grognet, S.; Coquerel, G.; Labat, B.; Atmani, H.; Ladam, G. Evidence of Different Growth Regimes Coexisting within Biomimetic Layer-by-Layer Films. *Soft Matter* **2011**, *7*, 9197–9205.
  36. Taddei, P.; Tinti, A.; Reggiani, M.; Fagnano, C. *In Vitro* Mineralization of Bioresorbable Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/Apatite Composites for Bone Tissue Engineering: A Vibrational and Thermal Investigation. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744–747*, 135–143.
  37. Fowler, B. O.; Markovic, M.; Brown, E. W. Octacalcium Phosphate. 3. Infrared and Raman Vibrational Spectra. *Chem. Mater.* **1993**, *5*, 1417–1423.
  38. Crane, N. J.; Popescu, V.; Morris, M. D.; Steenhuis, P.; Igelzi, M. A. Raman Spectroscopic Evidence for Octacalcium Phosphate and Other Transient Mineral Species Deposited during Intramembranous Mineralization. *Bone* **2006**, *39*, 434–442.
  39. Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid–Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Phys. Scr.* **1999**, *59*, 391–396.
  40. Oliver, W. C.; Pharr, G. M. An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments. *J. Mater. Res.* **1992**, *7*, 1564–1583.

### ***III.3 Résultats et discussion***

Le tissu cartilagineux contrairement au tissu osseux, une fois altéré n'a pas de capacité d'autorégénération (Hunsiker, 2002). Son atteinte peut-être localisée (cas des ostéochondrites) ou diffuse (arthrose, arthrites inflammatoires ou septiques). L'arthrose est une affection dégénérative chronique d'une très grande fréquence : on estime le nombre de patients arthrosiques consultant chaque année en France à 3,5 millions. Ce chiffre devrait encore croître dans les années à venir, face à l'augmentation de l'espérance de vie et de la population de gens âgés. L'arthrose touche aussi le sujet jeune, car elle peut être secondaire à un traumatisme (fracture articulaire, évolution secondaire d'une rupture ligamentaire...). Dans toutes ces circonstances, la problématique reste la même : comment régénérer l'unité ostéo-chondrale (*id est* le cartilage et son sous-sol : l'os sous-chondral) sans avoir recours aux arthroplasties de remplacement articulaire. Des techniques chirurgicales à visée curative existent mais quelle est la qualité du néocartilage à distance ? Les premières visent à remplacer du cartilage soit par un procédé de mosaïque-plastie (Robert, 2011) soit par des techniques de greffe en prélevant du cartilage costal par exemple (Tropet *et al*, 2006) (Obert *et al*, 2011) (Huard *et al*, 2011) (Zapparterra *et al*, 2011). Les secondes visent à stimuler la moelle osseuse sous-jacente, comme le fraisage-avivement de l'os sous-chondral sous arthroscopie avec injection secondaire intra-articulaire de cellules souches autologues (Saw *et al*, 2009) (Saw *et al*, 2011) ou la réalisation de microfractures (Gomoll *et al*, 2010).

Le problème de la régénération du cartilage est d'arriver à régénérer du cartilage avec son sous-sol nutritif : l'os sous-chondral. Il faut donc pour reformer cette unité os-cartilage trois conditions : une matrice 3D, des facteurs de croissance et des contingents cellulaires de différentes lignées. La première condition était de reproduire la MEC 3D : elle a été remplie grâce à l'obtention de membranes nanofibreuses. D'une part les fibres de polymère (PCL) composant la MEC sont résorbables et d'autre part sa structure est fibrillaire avec des fibres de petite taille. En effet, l'idée était de mimer la MEC de tissu cartilagineux. Car les MEC ont une architecture naturelle de type fibrillaire et les biomatériaux doivent se rapprocher de cette architecture. Les fibres avec un diamètre de moins de 700 nm sont colonnisées facilement par les cellules. Or la méthode d'*electrospinning* nous a permis de déposer et de former des fibres de PCL pouvant atteindre une taille comprise entre à 50 et 700 nm (Kenawy *et al*, 2003). La seconde condition était d'avoir un matériau actif avec des facteurs de croissance sous forme

de nanoréservoirs tapissant les nanofibres de PCL. Ces nanoréservoirs permettent, de protéger la BMP-2 d'une lyse trop rapide, et une libération prolongée de ce médicament stocké ainsi à faible concentration et non cytotoxique. C'est la dégradation enzymatique des cellules qui va libérer le principe actif des nanoréservoirs, en parallèle de la dégradation des nanofibres de polymères (PCL). La BMP-2 a été stockée dans l'architecture nanofibrillaire de notre membrane par un simple procédé d'adsorption sans liaison covalente. Elle reste ainsi dans sa forme active. L'analyse en QCM-D a permis de constater la bonne construction du film de multicouches (DGL<sup>G5</sup>-BMP-2)<sub>n</sub> et son épaisseur. Des nanoréservoirs ont bien été observés en microscopie à balayage à la surface des nanofibres de PCL, par rapport aux membranes non fonctionnalisées.

Ces membranes nanostructurées ont été testées *in vitro* sur des ostéoblastes primaires en culture. En immunofluorescence, on a pu constater une expression du gène de l'ostéocalcine, de la protéine *bone sialoprotein*, et de l'ostéopontine, caractéristique de l'ostéoformation seulement avec les membranes nanofonctionnalisées. Après 21 jours de culture, une minéralisation a aussi été constatée avec un dépôt de phosphate de calcium. Puis ces membranes nanostructurées ont été testées *in vivo* en site *calvaria* pour voir leur capacité d'ostéoinduction : là aussi de l'os s'est formé à la surface des membranes, mais seulement si elles étaient nanofonctionnalisées avec nos nanoréservoirs de BMP-2. De l'os bien minéralisé est aussi constaté sur les explants, après seulement un mois d'implantation.

Ces membranes nanostructurées ont été testées *in vivo* en position ectopique pour voir leur capacité d'induction de néocartilage et d'os sous-chondral, puis en position *in situ* en *calvaria* pour évaluer leur biocompatibilité. Dans ces 2 sites d'implantation, nos membranes nanostructurées avec les nanoréservoirs sont capables d'induire à leur surface : une première couche intermédiaire d'os sous-chondral et une seconde couche de cartilage, très bien visualisées en coupe histologique.

L'intérêt de ces membranes réside surtout dans leur utilisation de nanoréservoirs. Dans la pratique courante certains facteurs de croissance, comme la Rh-BMP-2 ou Rh-BMP-7 (InductOs® ou Osigraft®) sont utilisés dans la cure des pseudarthroses des os longs (Obert *et al*, 2009) (Gindraux *et al*, 2010). Mais à des doses de l'ordre du mg/L de Rh-BMP-2 sur des éponges de collagène ou libre pour la Rh-BMP-7. Les nanoréservoirs permettent d'une part, d'utiliser des doses nanométriques et d'autre part de protéger la molécule, qui reste active sur le site implantatoire plusieurs semaines et sans effets secondaires.



#### **IV - Propriétés nanomécaniques des membranes nanofibreuses**

**(Publication n°4 soumise)**

**“ Nanomechanical properties of retrieved nanofibers implants for subchondral bone regeneration as a function of constituents ”**

FACCA S, FERRAND A, MENDOZA-PALOMARES C, LAHIRI D, FIORETTI F,  
MAINARD D, AGARWAL A, BENKIRANE-JESSEL N. *Small*, 2012 (submitted)

## **IV.1 Résumé du travail**

### **Objectifs**

Dans le cadre de la régénération ostéo-chondrale, nous avons voulu développer un biomatériau actif selon les principes de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire moderne. Les nanotechnologies nous permettent de créer des implants de petite taille mais aussi d'architecture fibrillaire, afin que l'implant reproduise une matrice 3D et puisse avoir au final les mêmes caractéristiques mécaniques que le tissu osseux ou cartilagineux. Le biomatériau nanostructuré mis au point, étant une membrane de nanofibres contenant des nanoréservoirs de facteurs de croissance, spécialement conçu pour remplacer l'unité ostéo-chondrale (os sous-chondral et cartilage), devait présenter les mêmes propriétés mécaniques soit la même résistance et la même élasticité, que du tissu ostéo-articulaire natif. Ce cahier des charges atteint, on pourrait envisager une utilisation clinique avec une implantation mini-invasive pour réparer durablement des lésions du cartilage de surface minime (entre 2-4 cm<sup>2</sup>).

### **Méthodes**

Nous avons dans un premier temps synthétisé des membranes de 50 µm d'épaisseur avec des nanofibres de 500 nm de diamètre de PCL (Poly ε-caprolactone) par la méthode d'*electrospinning*. Puis dans un second temps, nous avons utilisé la méthode du film de multicouches avec des polyélectrolytes (soit avec du PLL, soit avec du DGL) pour incorporer un facteur actif : la BMP-2. Enfin ces implants ont été rendus vivants par dépôts de différents types cellulaires, avec obtention de 5 types d'implants différents selon le schéma suivant :

- Implant 0 : membrane E (contrôle)
- Implant 1 (membrane A) : implant 0 + ostéoblastes humains
- Implant 2 (membrane B) : membrane/BMP-2 + ostéoblastes humains
- Implant 3 (membrane C) : implant 2 + lattis de collagène + ostéoblastes humains
- Implant 4 (membrane D) : implant 3 + gel d'Alginate + chondrocytes humains

Tous ces implants ont été testés *in vitro*, puis implantés *in vivo* 2 mois chez la souris nude (en site *calvaria*) avant explantation et analyses. Les propriétés mécaniques des implants ont été testées par nanoindentation et l'apparition d'une biominéralisation par immunofluorescence.

## **Résultats principaux**

*In vitro* comme *in vivo*, les implants en fonction de leur contingent cellulaire ont induit du tissu osseux (par exemple pour l'implant 3) ou cartilagineux (implant 4). Nous reportons ici la première démonstration d'implants bioactifs et vivants aux mêmes propriétés nanomécaniques que le tissu osseux ou ostéo-chondral. Le biomatériau obtenu (membranes de nanofibres) donne un support 3D aux cellules, grâce à sa structure fibrillaire. En plus de cette architecture 3D, il contient des facteurs de croissance osseux qui vont être libérés de façon progressive lors la dégradation des multicouches (principes des nanoréservoirs de BMP-2). Ainsi le biomatériau nanostructuré permet une interaction avec les contingents cellulaires et va guider dans le temps et dans l'espace le processus complexe de formation et de régénération tissulaire souhaité. Nous avons obtenu des implants permettant une régénération de l'os sous-chondral plus une induction de cartilage sus-jacente : cette unité ostéo-chondrale ayant les mêmes propriétés nanomécaniques que les tissus cartilagineux.

## **Conclusions du travail**

Nous avons développé une nouvelle stratégie dans le cadre de la nanomédecine régénérative pour restaurer l'unité ostéo-chondrale : avec induction du lit sous-chondral plus induction de tissu cartilagineux sur le même implant, ayant au final les mêmes propriétés mécaniques du tissu ostéo-chondral.

**Mots clés :** régénération ostéo-chondrale, BMP-2, chondrocytes, ostéoblastes, nanoindentation.

## Nanomechanical Properties of Retrieved Nanofibers Implants for Subchondral Bone Regeneration as a Function of Constituents

S Facca, A Ferrand, C Mendoza-Palomares, D Lahiri, F Fioretti, G Schlatter, D Mainard, A Agarwal\* and N Benkirane-Jessel\*

Prof. N. Benkirane Jessel, A. Ferrand<sup>[+]</sup>, S. Facca<sup>[+]</sup>, C. Mendoza-Palomares<sup>[+]</sup>, Dr. F. Fioretti<sup>[+]</sup>  
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 977, 11 rue Humann,  
Strasbourg, France.

Prof. A. Agarwal, Dr. D. Lahiri<sup>[+]</sup>  
Plasma Forming Lab and Nanomechanics and Nanotribology Lab. Department of Mechanical and  
Materials Engineering, Florida International University, Miami, FL 33174, USA

C. Mendoza-Palomares<sup>[+]</sup>, Dr. F. Fioretti<sup>[+]</sup>  
Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg, France.

A. Ferrand<sup>[+]</sup>, Dr. G. Schlatter  
LIPHT, (UMR CNRS 7165) ECPM, 25 rue Becquerel F-67087 Strasbourg Cedex 2.

Prof. N. Benkirane Jessel, Prof. D. Mainard  
Hôpital Central, Service de Chirurgie Orthopédique and CNRS UMR 7561, Nancy, France.

S. Facca<sup>[+]</sup>  
Hand Surgery Department, Strasbourg Hospitals University

<sup>[+]</sup>These authors contributed equally to this research

(This work was supported by the project NanoOscar from the "Agence Nationale de la Recherche, ANR" and "Alsace contre le Cancer", C.M and V.M thank the Faculté de Chirurgie Dentaire 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). 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).)

**Keywords:** Osteochondral regeneration, BMP-2, Osteoblast, Chondrocyte, Nanoindentation

Aging is a global phenomenon. The world's elderly population aged 60 and over is the fastest growing age group. This is a positive sign of improving health. Nevertheless, along with it come new health challenges. The opportunities for nanomedicine to maintain the health of this aging population are limitless. For successful regenerative medicine, tissue-engineering strategies based on new nanostructured and living implants become crucial. Osteoarthritis, as a classic age-related disease (joint pain and articular cartilage degeneration), is an obvious major focus of applied research in nanomedicine. For articular damage, the aim is to achieve a predictable and durable cartilage repair. It is becoming apparent that without support from an intact subchondral bed, any treatment of the surface chondral lesion is likely to fail. The treatment goal for large chondral or osteochondral defects should be to restore the physiological properties of the entire osteochondral unit. We report here the first demonstration of an active nanofibers membrane, incorporating growth factors, for subchondral bone regeneration *in vivo* and the nanomechanical properties of the retrieved implants.

With the aging of the population and a correlated increase in the incidence of osteo-articular damage great attention is focused on tissue engineering solutions to restore durable articular function and comfort. This is considered a highly accessible 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. Engineering materials on this nano-scale allow for novel medical therapies such as designing nanoparticle-based drugs that target cells with improved specificity, resulting in decreased side effects for patients. Other advances are being made in nanostructured biomaterials for use in surgical implantations that are less invasive, 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 could reduce the overall cost of healthcare. 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.

The materials focus is limited to 3-D applications and is on emerging classes of polymeric biomimetic materials, such as nanofibrillar, supramolecular materials formed by self-assembly processes, and matrices presenting individual or multiple biochemical extra-cellular matrix (ECM)-derived signals. The guidance provided by biomaterials may facilitate restoration of structure and function of damaged or dysfunctional tissues. Such materials should provide provisional 3-D support to interact with cells to control their function, guiding the spatially and temporally complex multicellular processes of tissue formation and regeneration.<sup>1-6</sup> Current methods aimed at repairing full-thickness cartilage defects include marrow-stimulation techniques (MST), such as subchondral drilling, abrasion, arthroplasty and microfracture.<sup>7</sup> For example, MST attempts to stimulate filling of a cartilage defect with reparative tissue resulting from perforation of the subchondral bone. There are, however, concerns over the durability of the repair tissue and hence the clinical outcome, especially in defects that are larger than 2–4 cm<sup>2</sup> and located in areas other than the femoral condyles.<sup>8</sup> These limited techniques are generally not sufficient to restore a durable cartilage repair. It is becoming apparent that without a healthy subchondral bed, the entire osteochondral unit is likely to fail. Therefore, the future of articular cartilage repair depends on the development of advanced implants that will allow the replacement of the entire osteochondral unit. Recently, the development of advanced materials based on ECM analogues has become a major focus of applied research in regenerative medicine. Until now, different studies have focused on either bone or cartilage regeneration and never on the restoration of the entire osteo-chondral unit. Our objective is to propose a new strategy based on ECM synthetic materials to restore the osteochondral unit.

The intricate fibrillar architecture of natural ECM components has inspired several researchers to produce materials with similar structure. Upon fibers that are tens of microns in diameter, cells seem to respond as though to a 2-D 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 urinary bladder<sup>9</sup> or as scaffolds for neural stem cells to facilitate regeneration after brain injury in a mouse stroke model<sup>10</sup>. Polymer processing technologies such as electrospinning<sup>11</sup> allow fiber formation down to the 150 nm scale. In this study we have used the polymer PCL (Poly  $\epsilon$ -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.<sup>12</sup> Polyelectrolyte multilayer (PEM) films incorporating functional proteins and other bioactive materials provide one example<sup>13</sup>. PEM films are prepared by the layer-by-layer (LbL) deposition of interacting materials, typically by the electrostatic interaction of oppositely charged polyelectrolytes.<sup>14</sup> 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.<sup>13-15</sup> These supramolecular nanoarchitectures can be designed to exhibit specific properties, including control of cell activation, inflammation<sup>16-17</sup> and localized drug, growth factor or nucleic acid delivery.<sup>18-19</sup> The embedded biomolecules, which are either chemically bound to polyelectrolytes or physically adsorbed, have been shown to retain their biological activity in many studies.<sup>16-20</sup> 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.<sup>21-26</sup> Our strategy for generating subchondral bone couples the use of an active matrix, as described, with cellularized hydrogels. In this study we have used BMP-2 as a growth factor to functionalize multilayered electrospun nanofibers of PCL (Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)).

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. In particular it is especially interesting for the preparation of long-term implantable devices, owing to its degradation, which is even slower than that of polylactide. PCL is an Food and Drug Administration (FDA) approved material that is used in the human body as, for example, a drug delivery device, suture (sold under the brand name Monocryl or generically), or adhesion barrier.

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 able not only to modulate inflammation but also to increase the proliferation of cells in contact with this multilayered film.<sup>26</sup> 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). To analyze the incorporation of BMP-2 into the multilayered films (DGL<sup>G5</sup>-BMP-2)<sub>n</sub>, the build up was followed by (Quartz micro balance, QCM-D) and a linear increase of thickness was shown after each deposition (data not shown). We have also analyzed by immunochemistry the capacity of these nanoreservoirs, in the presence of human osteoblasts, to induce *in vitro* specific gene expression (Figure 1A). We have also analyzed



the efficiency of this nanostructured BMP-2 active implant to induce bone-cartilage unit induction *in vivo* after 30 days of implantation (Figure 1B). And we have confirmed the presence of mineralized nodules in living human osteoblastic culture *in vitro* after 16 days with these bioactive implants (Figure 1C).

At this step, our results indicate clearly that we are able to (i) design an electrospun nanofibers membrane (thickness and size controlled), incorporating BMP-2 (Implant 2). (ii) Induce bone formation *in vivo* after implantation in mice. This membrane 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 3) and have shown bone induction. We have also manufactured an implant 4 by adding a mixed alginate/ human chondrocytes to the implant 3 and have shown bone/cartilage unit induction (Figure 1B).

After 2 months of implantation on nude mice (males, 16 weeks-old) (**Figure 2**), 5 types of implants were analyzed:

- Implant 0: membrane E (control)
- Implant 1 (A): Implant 0 + h Osteoblasts
- Implant 2 (B): membrane/BMP2 + h Osteoblasts
- Implant 3 (C): Implant 2 + mixed Collagen/ h Osteoblasts
- Implant 4 (D): Implant 3 + mixed Alginate /h Chondrocytes

We have also analyzed normal bones as control sample.

Our results indicate clearly that by using these active nanofibers membranes, incorporating BMP-2, we are able to induce bone formation and subchondral bone regeneration *in vivo*. We have also analyzed the nanomechanical properties of the retrieved implants and shown that the bone near the membrane E (control) has an elastic modulus ( $6.39 \pm 2.06$  GPa) and hardness ( $0.29 \pm 0.05$  GPa) quite similar to the normal bone ( $6.13 \pm 0.43$  GPa and  $0.33 \pm 0.03$  GPa) (data not shown). Figure 3 shows the comparison of elastic modulus, hardness and representative loads vs. displacement plots for each of the membranes. The load-displacement curves with well-defined unloading portion provide confidence about the elastic modulus values. Elastic modulus on membrane B (Implant 2) ( $2.19 \pm 0.39$  GPa) is slightly increased in comparison with membrane A (Implant 1) ( $1.74 \pm 0.65$  GPa). These results could be explained by the positive effect of the incorporation of BMP-2 as a coating of the nanofibers membrane B (Implant 2). Interestingly, the highest value of elastic modulus was measured on membrane C (Implant 3) ( **$14.26 \pm 2.16$**  GPa). In this case, we have not only the active nanoreservoirs of BMP-2 like on membrane B but also a mixed collagen and human osteoblasts. This membrane induces more bone formation and could be used for large bone lesions. Our results indicate clearly that the highest value of elastic modulus was measured on the membrane C (Implant 3) in accordance with more bone induction, while lowest value of elastic modulus was found on membrane D (Implant 4) ( **$0.65 \pm 0.45$**  GPa) corresponding to the cartilage induction in this condition in the presence of mixed alginate and chondrocytes.

The modulus and hardness values of normal mice bone or cartilage could be different because of different factors such as age of mice,<sup>27-28</sup> or localized area of skull chondracranium or calvarium, where indentation was made.<sup>29</sup> In this study, after comparison of different bones near implanted membranes, we have shown that values of elastic modulus and hardness were

increased when membranes (B, C and D) have a drug delivery system and bone growth factor (BMP-2) incorporated into the PEM films as a coating of the nanofibers. The skeletal 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 membranes.<sup>28</sup> Both mineral apposition and bone formation around membranes (B, C and D) are accelerated because of local effect of BMP-2, which is influencing bone's properties.<sup>30</sup> Concerning the membranes, the control membrane E shows the lowest values of elastic modulus and hardness due to soft fibrous tissue. Progressive additions of bone cells on membrane A, of BMP-2 on membrane B and as far, of collagen on membrane C has increased elastic modulus, because of the bone induction. Induction of a mineralized bone formation is obtained on membrane C. On the other side, cartilage induction was possible with the addition of chondrocytes on the top of membrane D. The elastic modulus and hardness values of the membrane D are lower due to cartilage formation, which is a hydrated soft tissue.<sup>31</sup>

As previously mentioned, in the absence of an intact subchondral bed (bone), treatment of a surface chondral lesion is prone to failure. We report here the first demonstration of an active hybrid implant for subchondral bone regeneration. These promising results point to potentially far more efficient surgical approaches than are currently available.

### **Experimental Section**

*Chemicals:* Poly( $\epsilon$ -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 DGLG5. 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.

*Electrospinning:* A homemade standard electrospinning set-up 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 0.5mm 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 (20x20 cm<sup>2</sup>), connected to the ground at a distance from the needle of 17 cm, was used to collect the electrospun PCL scaffold.

*Polyelectrolyte multilayered film preparation:* For all biological activity experiments, polyelectrolyte multilayer films were prepared on Electrospun PCL membrane. A films constituted by (DGLG5-BMP-2)<sub>n</sub> or (PLL-BMP-2)<sub>n</sub> were built by alternating immersion of the surfaces during 15 min in the respective solutions (300 µl) at the respective concentrations of 50 µM for DGLG5 or PLL and 200 nM of BMP-2 in presence of 0.02 M MES and 0.15M NaCl at pH=5.5. After each deposition step the membranes were rinsed during 15 min with 0.02 M MES and 0.15M 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 20cm). Before use, all membranes were equilibrated in contact with 1 ml of serum-free medium (see Cell culture).

*Cells 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 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL Amphotericin B and 10% FBS (Life Technologies, Paisley, UK). The cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. When the cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured.

*Implants preparation:* 5x10<sup>4</sup> human osteoblasts were seeded and incubated for 72h 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 2x10<sup>5</sup> cells/ml. 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. After polymerization, 0.5 ml of a human chondrocyte suspension (1x10<sup>5</sup> cells/ml) in an alginate hyaluronic acid solution (4:1) prepared in 0.15 M NaCl, pH 7.4 were poured on the top of the collagen lattice in order to obtain the 3-layered construct. 5 mm or 2 mm cylinders were cut using a sterile biopsy punch and incubated overnight at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> prior to in vivo experiments (calvaria).

*In vivo implantation:* In vivo implantation on skull of NMRI-nude mice: The surgical procedure involved removal of the hair over the head via shaving and cleaning. 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 were performed using an electrical drill with a sterile round bur under irrigation of sterile normal

saline before deposition of the 2 same membranes and sutures with Ethicon® 9/0 (see figure 2). The skin was closed with sutures and the animal's behavior 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 received 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".

*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.<sup>32</sup> 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.<sup>33</sup>

*Immunofluorescence:* Cells were fixed with 4% PFA during 1 hour, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 hour 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).

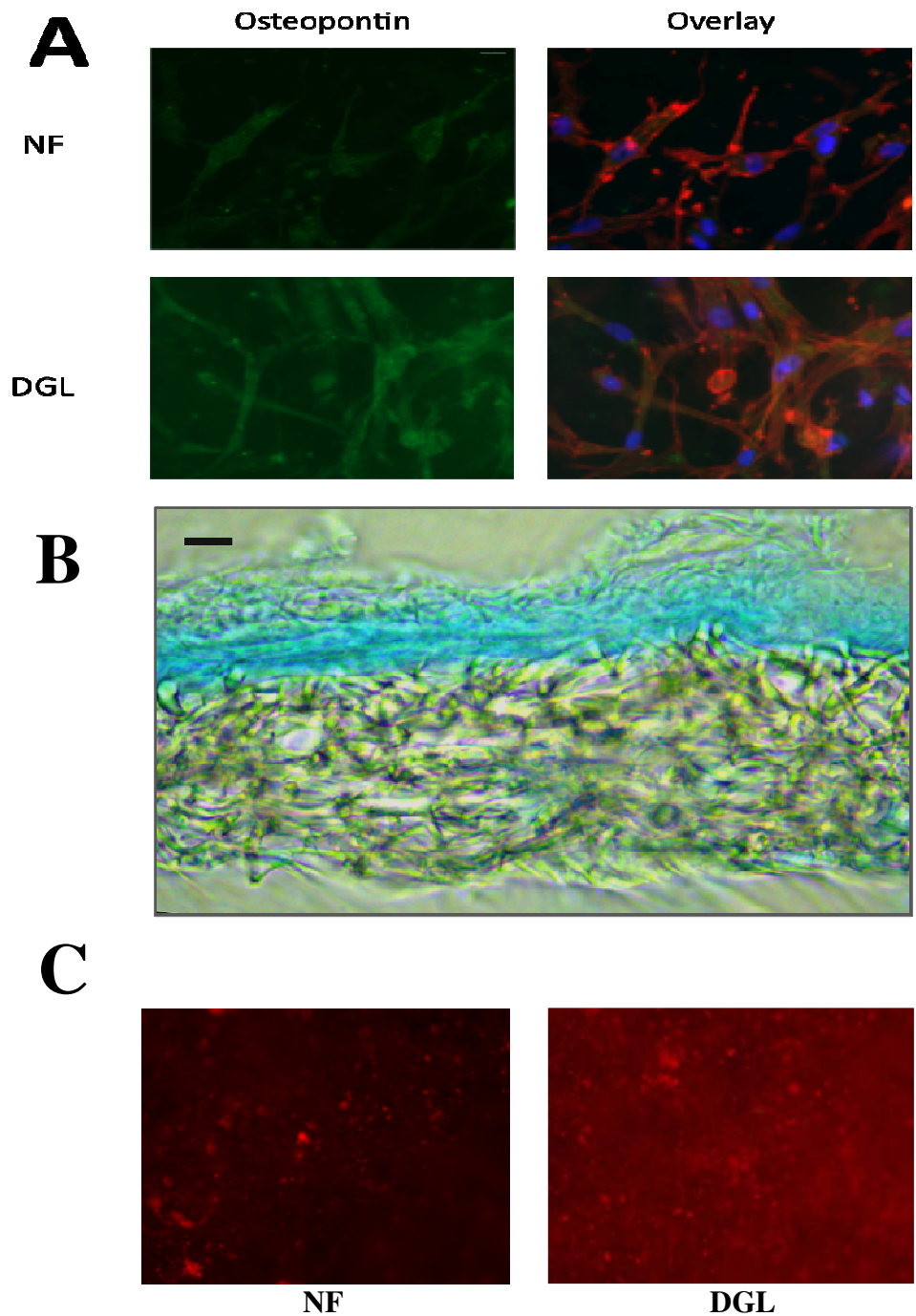


Cells were non fixed in PFA for tests of mineralization, but incubated with 20 mM of xylenol orange for 20 hours.

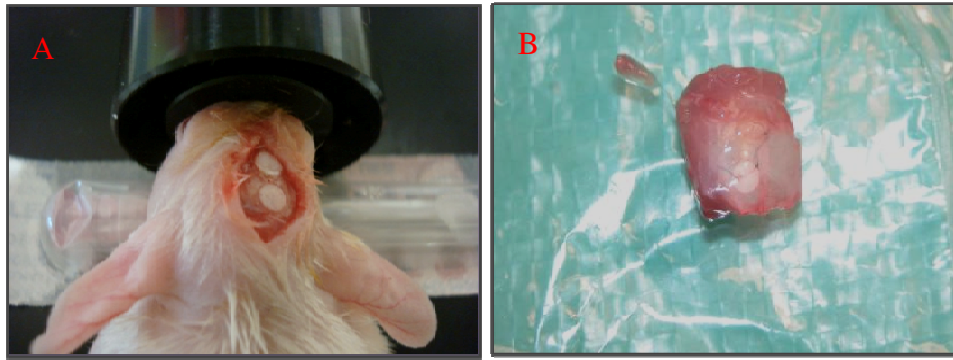
*Statistical analysis:* All values are expressed as mean  $\pm$  SEM and all experiments were repeated at least three times. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney U test. A probability p value  $<0.05$  was considered significant to reject the null hypothesis.

- [1] N.A. Peppas, R. Langer, *Science* 2008, 263, 1715.
- [2] J.A. Hubbell, *Biotechnology* (N Y) 1995, 13, 565.
- [3] R. Langer, D.A. Tirrell, *Nature* 2004, 428, 487.
- [4] C. Yang, P.J. Hillas, J.A. Báez, M. Nokelainen, J. Balan, J. Tang, R. Spiro, J.W. Polarek, *Bio. Drugs.* 2004, 18, 103.
- [5] L.G. Griffith, G. Naughton, *Science* 2002, 295, 1009.
- [6] T. Dvir, B.P. Tinko, D.S. Kohane, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* 2011, 6, 13.
- [7] A.H. Gomoll, H. Madry, G. Knutsen, N.V. Dijk, R. Seil, M. Brittberg, E. Kon, *Knee Surg. Sports Traumatol.. Arthrosc.* 2010, 18, 434.
- [8] P.C. Kreuz, M.R. Steinwachs, C. Erggelet, S.J. Krause, G. Konrad, M. Uhl, N. Südkamp, *Osteoarthritis Cartilage* 2006, 14, 1119.
- [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. Kenawy el, 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. Lavelle, 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.

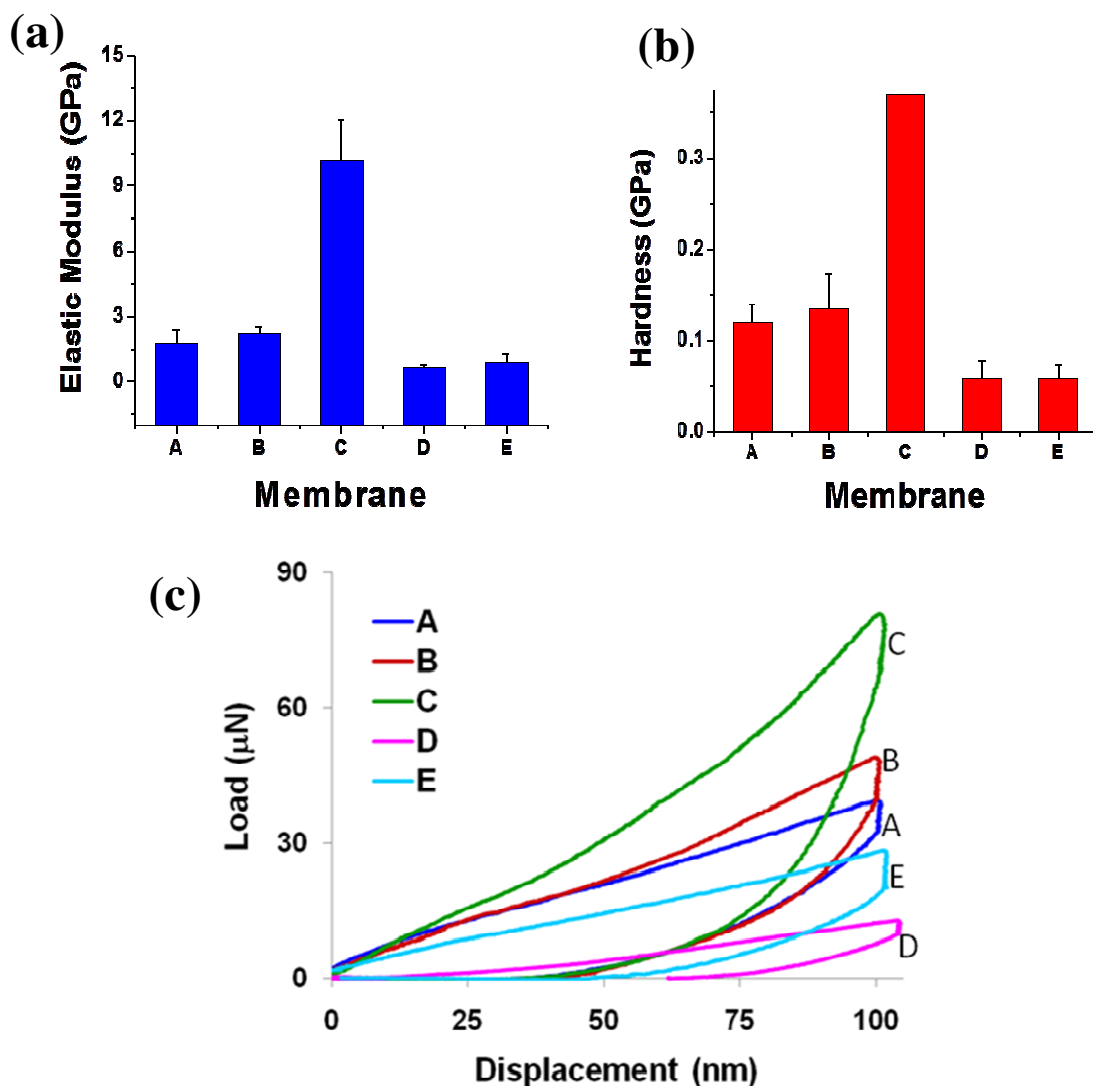
- [17] N. Benkirane-Jessel, P. Schwinté, P. Falvey, R. Darcy, Y. Haïkel, P. Schaaf, J.C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Funct. Mater.* 2004, *14*, 174.
- [18] N. Jessel, M. Oulad-Abdelghani, F. Meyer, P. Y. Lavalle, Haïkel, P. Schaaf, J.C. Voegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, *103*, 8618.
- [19] B.S. Kim, S.W. Park, P.T. Hammond, *ACS Nano* 2008, *2*, 386.
- [20] N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, E. Hübsch, V. Holl, B. Senger, Y. Haïkel, 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. USA* 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] C.P. Barnes, S.A. Sell, E.D. Boland, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2007, *59*, 1413.
- [25] H.S. Yoo, T.G. Kim, T.G. Park, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2009, *61*, 1033.
- [26] F. Fioretti, C. Mendoza-Palomares, M. Helms, D.A. Alam, L. Richert, Y. Arntz, S. Rinckenbach, F. Garnier, Y. Hakel, S.C. Gangloff, N. Benkirane-Jessel, *ACS Nano* 2010, *22*, 3277.
- [27] M.J. Silva, M.D. Brodt, Z. Fan, J.Y. Rho, *J. Biomechan.* 2004, *37*, 1639.
- [28] M.P. Akhter, J.K. Otero, U.T. Iwaniec, D.M. Cullen, G.R. Haynatzki, R.R. Recker, *Neuron. Interact.* 2004, *4*, 33.
- [29]. M. Macholan, *Zoologischer Anzeiger*, 2008, *247*, 315.
- [30] C. Lavet, Y. Lapusta, E. Toussaint, F. Labesse-Jied, G. Poumarat *Int. J. Fract.* 2009, *159*, 85.
- [31] S. Chiravambath, N.K. Simha, R. Namani, J.L. Lewis, *J. Biomech. Eng.* 2009, *131*, 011004.
- [32] S. Pathak, J.G. Swadener, S.R. Kalidindi, H.W. Courtland, K.J. Jepsen, H.V. J. Goldman, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2011, *4*, 34.
- [33] W.C. Oliver, G.M. Pharr, *J. Mater. Res.* 1992, *7*, 1564.



**Figure 1.** (A) Osteopontin expression in human osteoblasts growing on the surface of the multilayered (DGLG5-BMP-2)<sub>3</sub> films (DGL). NF (not functionalized films), (osteopontin expression in green; phalloidin staining for actin cytoskeleton in red and DAPI staining for the nucleus in blue), Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  (B) Bone-cartilage unit induction *in vivo* after 30 days of implantation of the implant 4: Alcian blue staining of Cartilage (in blue) regenerated on induced bone (subchondral bone), Scale bars: 5  $\mu\text{m}$ . (C) Detection of mineralized nodules in living human osteoblastic cultures (after 16 days); incubation with xylenol orange; on the surface of the multilayered (DGLG5-BMP-2)<sub>3</sub> films (DGL). NF (not functionalized films).



**Figure 2.** (A) *In vivo* implantation on Nude mice skull. 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 2 same membranes. The skin was closed with non-absorbable sutures. (B) Retrieved implant (membranes attached on bone skull mice) after 2 months implantation.



**Figure 3.** Bar charts showing (a) elastic modulus and (b) hardness of membrane A (implant 1), membrane B (implant 2), membrane C (implant 3), membrane D (implant 4), and membrane E (implant 0, control). (c) Representative load vs. displacement plot for all the membranes.

#### **IV.4 Résultats et discussion**

En se basant sur la publication n°3, cette partie de notre travail a concerné l'aspect biomécanique des membranes nanofibreuses. L'analyse des coefficients d'élasticité (E) des différents implants (membranes et différents contingents cellulaires) implantées chez la souris en *calvaria*, nous a permis de confirmer les résultats des analyses histologiques et microscopiques. Pour rappel, nous avons implantés :

- Implant 0 : membrane E (contrôle)
- Implant 1 (membrane A) : implant 0 + ostéoblastes humains
- Implant 2 (membrane B) : membrane/BMP-2 + ostéoblastes humains
- Implant 3 (membrane C) : implant 2 + lattis de collagène + ostéoblastes humains
- Implant 4 (membrane D) : implant 3 + gel d'Alginate + chondrocytes humains

La caractérisation du néocartilage d'un point de vue biomécanique confirme que les membranes de type D qui induisent du cartilage à leur surface, sont celles qui ont le plus faible coefficient E, le néocartilage étant un tissu mou (Chiravarambath *et al*, 2009). Inversement les membranes de type C fonctionnalisées, vivantes (ajout d'ostéoblastes) et avec une matrice 3D (lattis de collagène) induisent de l'os minéralisé ont le coefficient E le plus élevé. Il existe un gradient progressif net de ce coefficient d'élasticité, en fonction de l'ajout de composants sur la membrane : ajout d'ostéoblastes (membrane A), puis de BMP-2 (membrane B), puis de collagène (membrane C). L'ostéof ormation est plus rapide à chaque étape par ajout d'un composant. L'analyse des propriétés mécaniques autour des implants nous apporte deux données supplémentaires. Elle nous permet de conclure d'une part, qu'il y a un effet périphérique de la BMP-2 sur l'os autour des membranes (diffusion locale, système de relargage progressif de la drogue) sur un os encore en croissance (Akhter *et al*, 2004) et d'autre part qu'il n'y a pas d'altération de l'os natif à distance (Macholan, 2008) (Lavet *et al*, 2009), nos implants sont bien tous biocompatibles. Les résultats de cette 4<sup>ème</sup> étude démontrent que ces membranes avec nanorésevoirs de BMP-2 peuvent être utilisées pour la régénération ostéo-articulaire. Nous sommes en mesure de proposer un biomatériau facile à produire, de petite taille pour l'implantation (voie arthroscopique), dégradable (en fibres de PCL), fonctionnalisé avec des facteurs de croissance encapsulés, ostéoinducteur *in vitro* et *in vivo* et induisant du néocartilage (qui possède bien les propriétés nanomécaniques du tissu cartilagineux). L'édifice multicomposite (os-cartilage) qui est induit sur la membrane est stable dans le temps et mime parfaitement le cartilage natif avec son lit : l'os sous-chondral.

## **CHAPITRE IV : CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**



Ces travaux ont eu pour but de résoudre les problèmes pratiques rencontrés en chirurgie de l'appareil locomoteur (déficits osseux ou cartilagineux localisés, ostéointégration de prothèses) et de s'intéresser aux pathologies dégénératives à fort retentissement socio-économiques, telles l'arthrose. Or l'arsenal thérapeutique actuel utilisable en pathologie osseuse et articulaire, s'arme de greffons synthétiques ou autologues, de prothèses recouvertes d'hydroxyapatite, de biomatériaux résorbables mais inactifs, de doses libres de BMP-2, BMP-7 ou d'acide hyaluronique, de cellules souches autologues, mais ne permet pas de solutionner tous ces problèmes. Afin de résoudre ces problèmes, l'apport et la combinaison des nanotechnologies et des techniques d'ingénierie tissulaire à des fins de nanomédecine régénérative sont une voie prometteuse.

Concernant les pathologies osseuse, ostéo-articulaire, ou l'ostéointégration des implants orthopédiques, nous avons essayé grâce à l'ingénierie tissulaire et à l'apport des nanotechnologies de fonctionnaliser des implants, afin de stimuler les processus physiologiques de formation tissulaire.

En conclusion, durant ce travail, Nous avons développé 3 types d'implants destinés à la chirurgie orthopédique, qui après des études *in vitro* et *in vivo* concluantes, devraient pouvoir être implantés chez l'homme. Des études complémentaires *in vivo* sur le gros animal, en terme de durée (années) et de faisabilité technique (comme la suture sous arthroscopie des membranes dans une articulation fémoro-patellaire) doivent être préalables à toute étude clinique. Ces implants restent prometteurs, surtout qu'ils répondent parfaitement au cahier des charges de la chirurgie du futur, grâce à leur nanoreservoirs actifs: implants résorbables, implants actifs contenant des médicaments, petits implants pour une insertion de type « mini-invasive » ou percutanée, et enfin implants vivants avec cellules qui peuvent être prélevées sur le patient lui-même quelques semaines avant ou en per-opératoire.

L'ensemble de notre travail nous a permis de mettre au point 3 stratégies thérapeutiques différentes :

**(i)** la première stratégie sous forme d'implants en titane fonctionnalisés, a eu pour application clinique l'augmentation de l'ostéointégration des implants orthopédiques. En effet en chirurgie arthroplastique, plusieurs problèmes restent non résolus pour le chirurgien orthopédiste en 2012 et notamment le descellement des prothèses. Cette dernière complication est pour certains une évolution inéluctable dans un délai d'environ 20 ans (Langlais *et al*,

1997). Si dans les cas de descellement précoce, il s'agit d'une complication mécanique de la fixation à l'os, le descellement tardif semble plus être la conséquence d'une ostéolyse péri-prothétique. Celle-ci est due à un pannus inflammatoire, notamment constitué par des macrophages, activés par les débris d'usure. Les auteurs ont montré le caractère non spécifique de cette ostéolyse, qui survient avec les débris d'usure de tous les biomatériaux. Différentes voies de recherche, pour d'une part augmenter l'ostéointégration des implants et d'autre part réduire l'usure (Boulila *et al*, 2008) ou remplacer les biomatériaux sont en cours. Les progrès de la recherche en longévité des prothèses passent par des équipes comportant des chercheurs-chirurgiens, trait d'union entre les recherches mécaniques et biologiques sur les biomatériaux. Nos implants en titane fonctionnalisés par de l'HA et des NTC augmentant l'ostéointégration, on pourrait donc envisager de reproduire ce *coating* composite à la surface de prothèse en titane et d'espérer une diminution du taux de descellement.

En terme de perspective, les nanotubes de carbone peuvent être aussi fonctionnalisés, notamment sur leur groupement -COOH. On pourrait ainsi imaginer de fonctionnaliser les implants orthopédiques (ayant un *coating* mixte HA-CNT actif) par simple immersion, dans une solution contenant des médicaments (Ren *et al*, 2010). Ainsi avant leur implantation, pourquoi ne pas “ immerger ” la prothèse dans une solution de Rh-BMP2 pour éviter les descellements précoces, ou dans du sulfate de gentamicine pour diminuer le taux de sepsis post-opératoire.

**(ii)** la deuxième stratégie sous forme de capsules implantables ou injectables peut avoir pour application clinique la régénération d'os ostéoporotique. Dans notre étude, la capsule active présente l'avantage d'être fonctionnalisée par deux facteurs de croissance osseux. Une des perspectives serait que ces capsules ostéoinductrices implantées directement par voie percutanée dans de l'os spongieux ostéoporotique pourraient régénérer le tissu osseux. On peut penser que l'os remplacerait alors le gel d'alginate, en tant que « matrice » et que les cellules souches mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse pourraient se différencier en ostéoblastes grâce à la libération contrôlée des facteurs de croissance.

**(iii)** la troisième stratégie sous forme de membranes nanofibreuses peut avoir comme application clinique de la régénération de l'os et du cartilage. Certaines membranes, mais en collagène sont déjà utilisables (*BioGuide®*, *Geistlich*, Suisse). Des études *in vivo*

sont d'ailleurs en cours avec cette membrane de collagène pour pouvoir tester le principe de nanoréservoir et passer à l'étape humaine rapidement, mais il ne faut pas oublier qu'il s'agit de collagène d'origine animal avec des problèmes de compatibilité d'espèce. L'étape suivante impliquera la même étude, mais menée en incluant des cellules souches humaines dérivées de la moelle osseuse dans les constructions des membranes. Elles seront testées dans un premier temps sur une lésion cartilagineuse d'une articulation de rat "*nude*", puis sur une lésion de patient atteint d'arthrose. L'étude inclura l'analyse de la cytocompatibilité, la cytotoxicité, la prolifération des cellules en lignée chondrocytaires. De nos jours les destructions articulaires surtout de nature arthrosique, sont un problème de santé publique, mais relèvent bien souvent d'un traitement palliatif. Une telle approche pourrait servir à préparer des matériaux actifs, dont la structuration se rapproche du tissu natif cartilagineux, tout en renforçant la stabilité de ces édifices multicomposites. La validation du concept ouvrirait des possibilités au niveau des perspectives de réparation tissulaire ostéoarticulaire à visée curative.

Ces membranes pourraient aussi être utilisées pour la cure des pseudarthroses. En effet, nous sommes capables de synthétiser des membranes plus épaisses. Leurs nanoréservoirs (contenant de la BMP-2) pourraient induire une régénération osseuse sans craindre de lyse rapide des facteurs de croissance. A l'heure actuelle rien ne prouve que ces éponges de collagène imbibées de Rh-BMP-2 permettent une libération contrôlée après leur implantation. Nos membranes, elles permettent une libération contrôlée et progressive.

Enfin, nous pouvons envisager de fonctionnaliser ces 2 derniers biomatériaux étudiés avec d'autres substances pharmacologiques. Ce phénomène d'incorporation de principes actifs dans des nanoreservoirs sur substrat (surface plane) a déjà été décrit pour des protéines et des anti-inflammatoires (Benkirane-Jessel *et al*, 2003) (Benkirane-Jessel *et al*, 2004) (Jessel *et al*, 2004) (Jessel *et al*, 2006) (Kim *et al*, 2008). Des applications cliniques semblent ainsi pouvoir s'étendre à d'autres pathologies de l'appareil locomoteur. On pourrait fonctionnaliser les capsules ou les membranes avec d'autres substances, que les facteurs de croissance. On peut penser à incorporer d'autres médicaments, qui resteraient bioactifs et protégés. Il serait intéressant ainsi de tester les antibiotiques, pour traiter localement les infections osseuses (ostéite) ou articulaires (arthrite) ; les anti-inflammatoires ou des immunosuppresseurs pour traiter les articulations atteintes de maladies rhumatismales (polyarthrite rhumatoïde) ; les bisphosphonates (comme modèle d'étude) pour lutter contre l'ostéoporose localisée typiquement au poignet, rachis ou col du fémur ou contre la lyse tumorale osseuse et prévenir

les fractures pathologiques ; voire les anti-tumoraux pour éviter les récurrences de métastases osseuses suite à une exérèse.

Ce principe de fonctionnalisation peut en fait s'appliquer à de nombreuses substances médicamenteuses. Les molécules sont ainsi encapsulées et protégées. Les nanoréservoirs permettent une libération progressive et constante dans le temps d'un principe actif, qui est alors administré localement au niveau de son site d'action. On pourrait ainsi réduire les doses injectées par voie systémique et les effets indésirables, tout en ayant une action thérapeutique ciblée et plus efficace. Par exemple, on pourrait appliquer ce principe de nanoréservoirs aux antibiotiques, dont la pharmacocinétique et la pénétration tissulaire dans le tissu osseux et le liquide articulaire sont mal connus et dépendent de l'état de la vascularisation (nécrose) de l'os. La durée d'un traitement d'une infection osseuse par antibiotiques est ainsi souvent longue (parfois plus de 3 mois) (Zeller *et al*, 2006) et peut induire des résistances.

L'ensemble de ces stratégies a pour finalité une nanomédecine régénérative osseuse (en ce qui concerne les implants en titane, les capsules et les membranes) et ostéo-articulaire (en ce qui concerne les membranes).

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- AI H, JONES SA, LVOV YM. Biomechanical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochem Biophys*, 2003, 39, 23-43.
- AKASAKA T, WATARI F, SATO Y, TOHJI K. Apatite formation on carbon nanotubes. *Mater Sci Eng C*, 2006, 26, 675-78.
- AKHTER MP, OTERO JK, IWANIEC UT, CULLEN DM, HAYNATZKI GR, RECKER RR. Differences in vertebral structure and strength of inbred female mouse strains. *J Musculoskel Neuron Interact*, 2004, 4, 33-40.
- ANAS EA. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release*, 2004, 94, 1-14.
- ARRINGTON ED, CHAMBERS HG, BUCKNELL AL, DAVINO NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 1996, 329, 300-9.
- ARYAL S, BAHADUR KCR, DHARMARAJ N, KIM N, KIM HY. Synthesis and characterisation of hydroxyapatite using carbon nanotubes as a nanomatrix. *Scr Mater* 2006, 54, 131-35.
- BALANI K, ANDERSON R, LAHA T, ANDARA M, TERCERO J, CRUMPLER J, AGARWAL A. Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts *in vitro*. *Biomaterials*, 2007, 28, 618-24.
- BALANI K, CHEN Y, HARIMKAR SP, DAHOTRE NB, AGARWAL A. Tribological behavior of plasma-sprayed carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite coating in physiological solution. *Acta Biomater*, 2007, 3, 944-51.
- BALANI K, AGARWAL A. Wetting of carbon nanotubes by aluminium oxide. *J Nanotechnol*, 2008, 19, 165701-8.
- BAREILLE R, LAFAGE-PROUST MH, FAUCHEUX C, LAROCHE N, WENZ R, DARD M, AMEEDIE J. Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials*, 2000, 21, 13, 1345-52.
- BARON R. L'ostéoblaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Médecine/Sciences*, 2001, 17, 1260-9.
- BASSET CAL, BECKER RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science*, 1962, 137, 1063-4.
- BEC S, TONCK A, LOUBET JL. *Mat Res Soc Symp Proc*, 1995, 356, 657-62.
- BELL E, IVARSSON B, MERRILL C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76, 1274-8.



- BENKIRANE-JESSEL N, ATALAR F, LAVALLE P, MUTTERER J, DECHER G, SCHAAF P, VOEGEL JC, OGIER J. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *AdvMater*, 2003, 15, 692-5.
- BENKIRANE-JESSEL N, SCHWINTE P, FALVEY P, DARCY R, HAÏKEL Y, ATALAR F, SCHAAF P, VOEGEL JC, OGIER J. Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Adv Funct Mater*, 2004, 14, 174-82.
- BERTS AB, SPORN MB. The transforming growth factor-betas. *Peptide growth factors and their receptors*, Sporn M.B., Roberts A.B., Springer Verlag Eds, Heidelberg, Germany, 1990, p 421-472.
- BOISSY P, MALAVAL L, JURDIC P. Ostéoblastes et ostéoclastes : une coopération exemplaire entre cellules mésenchymateuses et cellules hématopoïétiques. *Hématologie*, 6, 6-16.
- BOULILA A, JENDOUBI K, CHABRAND P, ZGHAL A, KHADHRAOUI M. Contribution à l'étude de l'usure des prothèses totales de hanche. Approche expérimentale sur stimulateur. *Mechanics & Industry*, 2008, 9, 323-33.
- BRODKIN KR, GARCIA AJ, LEVENSTON ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials*, 2004, 25, 5929-38.
- BUTTERY LDK, BOURNE S, XYNOS JD, WOOD H, HUGHES FJ, HUGHES SP, EPISKOPOU V, POLAK JM. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng*, 2001, 7, 89-99.
- CARUSO F, CARUSO RA., MOHWALD H. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science*, 1998, 282, 1111-4.
- CAMPBELL AA. Bioceramics for implant coatings. Bioceramics for implant coatings. *Mater Today*, 2003, 6, 26-30.
- CHIRAVARAMBATH S, SIMHA NK, LEWIS JL. Poroviscoelastic Cartilage Properties in the Mouse From Indentation. *J Biomech Eng*, 2009, 131, 011004-3.
- CHEN P, CARRINGTON JL, HAMMONDS RG, REDDI AH. Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. *Exp Cell Res*, 1994, 195, 509-15.
- CHENG C, MULLER KH, KOZIOL KKK, SKEPPER JNm MIDGLEY PA, WELLAND ME, PORTER AE. Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells. *Biomaterials*, 2009, 30, 4152-60.
- CHERUKURI P, BACHILO SM, LITOVSKY SH, WEISMANN RB. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J Am Chem Soc*, 2004, 126, 15638-9.

- CHEW KK, LOW KL, ZEIN SH, MCPHAIL DS, GERHARDT LC, ROETHER JA, BOCCACCINI AR. Reinforcement of calcium phosphate cement with multi-walled carbon nanotubes and bovine serum albumin for injectable bone substitute applications. *J Mechan Behav Biomed Mater*, 2011, 4, 331-9.
- CHLUBA J, VOEGEL JC, DECHER G, ERBACHER P, SCHAAF P, OGIER J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromol*, 2001, 2, 800-5.
- CHUA PH, NEOH KG, KANG ET, WANG W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials*, 2008, 29, 1412-21.
- CHUNG C, BURDICK JA. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60, 243-62.
- CORMIER C. Vitamine D et calcium. *Rev Rhum*, 2006, 73, 846-51.
- DANI C. Stem cells from human adipose tissue: a new tool for pharmacological studies and for clinical applications. *J Soc Biol*, 2006, 200, 45-50.
- DECHER G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 1997, 277, 1232-7.
- DEPREZ X. Prévention et traitements non-médicamenteux de l'ostéoporose post-ménopausique. *Rev Rhum*, 2006, 73, 852-8.
- DIERICH A, LE GUEN E, MESSADDEQ N, STOLTZ JF, NETTER P, SCHAAF P, VOEGEL JP, BENKIRANE-JESSEL N. Bone formation mediated by synergy-acting growth factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film. *Adv Mater*, 2007, 19, 613-97.
- DOETSCHMANN TC, EISTETTER H, KATZ M, SCHMIDT W, KEMLER R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 1985, 87, 27-45.
- DUBAS ST, KITTITHEERANUN P, SANCHAVANAKIT N, POTIYARAJ P. Coating of polyelectrolyte multilayer thin films on nanofibrous scaffolds to improve cell adhesion. *J Appl Polym Sci*, 2009, 114, 1574-9.
- ETIENNE O, GASNIER C, TADDEI C, VOEGEL JC, AUNIS D, SCHAAF P, METZ-BOUTIGUE MH, BOLCATO-BELLEMIN AL, EGLES C. Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials*, 2005, 26, 6704-12.
- FACCA S, GILLET P, STOLTZ JF, NETTER P, MAINARD D, VOEGEL JC, BENKIRANE-JESSEL N. Three-dimensional sprayed active biological gels and cells for tissue engineering application. *Biomed Mater Eng*, 2008, 18, 231-5.

- FACCA S, CORTEZ C, MENDOZA-PALOMARES C, MESSADEQ N, DIERICH A, JOHNSTON APR, MAINARD D, VOEGEL JC, CARUSO F., BENKIRANE-JESSEL N. Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 3406-11.
- FACCA S, GHERISSI A, LIVERNEAUX P. Contribution of computer assisted surgery in total wrist prosthesis: a comparative study of eight cases. *Int J Med Robotics Comput Assist Surg*, 2010, 6, 136-41.
- FACCA S, MENDOZA-PALOMARES C, PERRIN-SCHMITT F, MAINARD P, LIVERNEAUX P, BENKIRANE-JESSEL N. Bone formation by growth factors embedded into nanostructured particles. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, 7, 482-5.
- FACCA S, MENDOZA-PALOMARES C, PERRIN-SCHMITT F, MAINARD P, LIVERNEAUX P, BENKIRANE-JESSEL N. Capsules bioactives de multicouches pour l'induction osseuse. *E-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie*, 2011.
- FACCA S, LAHIRI D, FIORETTI F, MESSADEQ N, BENKIRANE-JESSEL N, AGARWAL A. *In vivo* osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants. *ACS Nano*, 2011, 5, 4790-9.
- FACCA S, MENDOZA-PALOMARES C, FERRAND A, FIORETTI F, MAINARD D, BENKIRANE- JESSEL N. Smart Nano-Reservoirs of growth factors for bone regeneration. *ACS Nano*, 2011, 6, 483-90.
- FAUCHAIS P, COUDERT JF, VARDELLE M. *J High Temp Mater Process*, 2002, 6, 247-67.
- FAUCHAIS P. Understanding plasma spaying. *J Phys D Appl Phys*, 2004, 37, R86-108. doi: [10.1088/0022-3727/37/9/R02](https://doi.org/10.1088/0022-3727/37/9/R02).
- FAYAZ HC, GIANNOUDIS PV PV, VRAHAS MS, SMITH RM, MORAN C, PAPE HC, KRETTEK C, JUPITER JB. The role of stem cells in fracture healing and non-union. *Int Orthop*, 2011, 35, 1587-97.
- FELSON DT, MC LAUGHKIN S, GOGGINS J, LAVALLEY M, GALE ME, TOTTERMAN S, LI W, HILL C, GALE D. Bone marrow edema (BME) and its relation to X-ray progression in knee osteoarthritis (OA). ACR, New orleans 24-29 october 2002, *Arthritis and Rheum*, 46, 9, S558.
- FERRAND A, MENDOZA-PALOMARES C, FIORETTI F, FACCA S, MAINARD D, DIERICH A, BENKIRANE-JESSEL N. Nanostructured active biomaterials for tissue engineering applications. *Open Conf Proc J*, 2010, 1, 197-9.
- FIORITTO S. *Carbon nanotubes. Angels or demons?*, 1st Ed, Pan Stanford Publications, Singapore, 2008, p 105-133.
- FORST H. The ADFR concept revisited. *Calcified tissue international*, 1984, 36, 349-53.
- FUKUDA E, YASUDA J. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Jpn*, 1957, 12,

1158-62.

FUKUOUKA K, HIRAI K, KUBO T, UKAI T, ESAKA M, KAJIYAMA S, MAEDA N, SATOMI K, HASHIMOTO M et al. An experimental study on bone tissue response to a titanium alloy coated with hydroxyapatite. *Hiroshima Daigaku Shigaku Zasshi*, 1988, 20, 175-9.

GAUTSCHI O, FREY SP, ZELLWEGE R. Bone morphogenic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg*, 2007, 77, 626-31.

GINDRAUX F, OBERT L, LAGANIER L, BARNOUIN L. Industrial approach in developing an advanced therapy product for bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*, 2010, 4, 194-204.

GOERGE JHS. *Engineering of fibrous scaffolds for use in regenerative medicine*. Department of materials, London, Imperial College of London, p 200.

GOMOL AH, MADRY H, KNUTSEN G, VAN DIJK N, SEIL R, BRITTBURG, KON E. The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2010, 18, 434-47.

GOULET JA, SENUNAS LE, GREENFIELD ML. Autogenous iliac crest bone graft, complications and functional assessment. *Clinical Orthopaedics*, 1997, 339, 76-81.

GRANT GT, MORRIS ER, REES DA, SMITH PJC, THOM D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett*, 1973, 32.

HAHN BD, LEE JM, PARK DS, CHOI JJ, RYU J, YOON WH, LEE BK, SHIN DS, KIM HE. Mechanical and *in vitro* biological performances of hydroxyapatite-carbon nanotube composite coatings deposited on Ti by aerosol deposition. *Acta Biomater*, 2009, 5, 3205-14.

HARADA H, TAGASHIRA S, FUJIWARA M, OGAWA M, KATSUMATA T, YAMAGUCHI A, KOMORI T, NAKATSUKA M. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, 1999, 274, 6972-8.

HEGERT C, KRAMER J, HARGUS G, MÜLLER J, GUAN K, WOBUS AM, MÜLLER PK, ROHWEDDEL J. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 2002, 115, 4617-28.

HERRERO-BEAUMONT G, IVORA JAR, TRABADO MDC, BLANCO FJ, BENITO P, MARTIN-MOLA E, PAULINO J, MARENCO JL, PORTO A, LAFFON A, ARAUJO D, FIGUEROA M, BRANCO J. Glucosamine Sulfate in the Treatment of Knee Osteoarthritis Symptoms : A randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study Using Acetaminophen as a Side Comparator. *Arthritis Rheum*, 2007, 56, 555-67.

HUNSIKER EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of a current status and prospects. *Osteoarth Cartil*, 2002, 10, 432-63.

HILLER J, MENDELSON JD, RUBNER MF. Reversibly erasable nanoporous anti-

- reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. *Nat Mater*, 2002, 1, 59-63.
- HUARD S, ROCHET S, LAPAGE D, GARBUIO P, OBERT L. New treatment of advanced Kienböck disease: replacement of lunate with costochondral autograft. *Chir Main*, 2011, 30, 211-7.
- HWANG GL, HWANG KC. Breakage, fusion, and healing of carbon nanotubes. *Nano Lett*, 2001, 1, 435-8.
- IJIMA S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 1991, 354, 56-8.
- ILLUM L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*, 15, 1326-31.
- JACOBSON BS, BRANTON D. Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. *Science*, 195, 302-4.
- JARCHO M. Biomaterial aspects of calcium phosphates. Properties and applications. *Dent Clin North Am*, 1986, 30, 25-47.
- JESSEL N, SCHWINTE P, DONOHUE R, LAVALLE P, BOULMEDAIS F, DARCY R, SZALONTAI B, VOEGEL JC, OGIER J. Pyridylamino- $\beta$ -cyclodextrine as a molecular chaperone for lipopolysaccharide embedded in a multilayer polyelectrolyte architecture. *Adv Funct Mater*, 2004, 14, 963-9.
- JESSEL N, OULAD-ABDELGHANI M, MEYER F, LAVALLE P, HAÏKEL Y, SCHAAF P, VOEGEL JC. Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by  $\beta$ -cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 23, 8618-21.
- JEYAM M, ANDREW JG, MUIR LT, Mc GOVERN A. Controlled trial of distal fractures treated with a resorbable bone mineral substitute. *J Hand Surg Br*, 2002, 27, 2, 146-9.
- KAGAN VE, KONDURU NV, FENG W, ALLEN BL, CONROY J, VOLKOV Y, VLASOVA II, Belikova, N.A.; YANAMALA N, KAPRALOV A, TYURINA YY, SHI J, KISIN ER, MURRAY AR, FRANKS J, STOLTZ D, GOU P, SEETHARAMALA N, FADEEL B, STAR A, SHVEDOVA AA. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nano*, 2010, 5, 354-9.
- KASAI T, MATSUMURA S, IIZUKA T, SHIBA K, KANAMORI T, YADASAKA K, IJIMA S, YOKOYAMA A. Carbon nanohorns accelerate bone regeneration in rat calvarial bone defect. *Nanotechnol*, 2011, 22, 065102.
- KEENEY M, LAI JH, YANG F. recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22, 1-7.
- KENAWY EL R, LAYMAN JM, WATKINS JR, BOWLIN GL, MATHHEWS JA, SIMPSON DG, WNEK GE. Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials*, 2003, 24, 907-13.
- KOLOSNAJ-TABI J, HARTMAN KB, BOUDJEMAA S, ANANTA JS, MORGANT G,

- SZWARC H, WILSON LJ, MOUSSA F. *In vivo* behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. *ACS Nano*, 2010, 4, 1481-92.
- KOSTARELOS K. Carbon nanotubes fibrillar pharmacology. *Nature Mater*, 2010, 9, 793-5.
- KIM BS, PARK SW, HAMMOND PT. Hydrogen-bonding layer-by-layer-assembled biodegradable polymeric micelles as drug delivery vehicles from surfaces. *ACS Nano*, 2008, 2, 286-92.
- KIM JY, KHANG D, LEE JE, WEBSTER TJ. Decreased macrophage density on carbon nanotube patterns on polycarbonate urethane. *J Biomed Mater Res*, 2009, 88, 419-26.
- KITSUGI T, NAKAMURA T, OKA M, SENAHARA Y, GOTO T, SHIBUYA T. Bone-bonding behavior of plasma-sprayed coatings of BioglassR, AW-glass ceramic, and tricalcium phosphate on titanium alloy. *J Biomed Mater Res*, 1996, 30, 261-9.
- KOSTARELOS K, BIANCO A, PRATO M. Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. *Nature Nanotechnol*, 2009, 4, 627-33.
- KUMAR K, VERMA AK, WILSON J, LAFONTAINE A. Vertebroplasty in osteoporotic spine fractures: a quality of life assessment. *Can J Neurol Sci*, 2005, 32, 487-95.
- KUO CK, MA PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 2001, 22, 899-907.
- LADAM G, SCHAAL P, VOEGEL JC, DECHER G, CUISINIER F. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, 2000, 16, 1249-55.
- LAFFARGUE P, HILDEBRAND HF, RTAIMATE M, FRAYSSINET P, AMOUREUX JP, MARCHANDISE X. Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects. *Bone*, 1999, 25, 55-8.
- LAHIRI D, SINGH Y, KESHRI AK, SEAL S, AGARWAL A. Wear behavior and *in vitro* cytotoxicity of wear debris generated from hydroxyapatite-carbon nanotube composite coating. *Carbon*, 2010, 48, 3103-14.
- LAHIRI D, BENADUCE AP, ROUZAUD F, SOLOMON J, KESHRI AK, KOS L, AGARWAL A. Wear behavior and *in vitro* cytotoxicity of wear debris generated from hydroxyapatite-carbon nanotube composite coating. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96, 1-12.
- LAVET C, LAPUSTA Y, TOUSSAINT E, LABESSE-JIED F, POUMARAT G. On measuring of overall mechanical properties of small animals bones using grid method. *Int J Fract*, 2009, 159, 85-92.
- LEE JY, KIM KH, SHIN SY, RHYU IC, LEE YM, PARK YJ, CHUNG CP, LEE SJ. Enhanced bone formation by transforming growth factor- $\beta$ 1-releasing collagen/chitosan

- microgranules. *J Biomed Mater Res*, 2006, 76, 530-9.
- LEE Y, GECKELER KE. Carbon Nanotubes in the biological interphase: the relevance of noncovalence. *Adv Mater*, 2010, 22, 4076-83.
- LEGRAND E, BOUVARD B, LEVASSEUR R, CHAPPARD D, AUDRAN M. La densitométrie osseuse. *Rev Rhum*, 2006, 73, 795-803.
- LEVY E, FERME A, PERROCHEAU D, BONO I. Les coûts socio-économiques de l'arthrose en France. *Rev Rhum*, 1993, 60, 63S-67S.
- LI A, SUN K, DONG W, ZHAO D. Mechanical properties, microstructure and histocompatibility of MWCNTs/HAp bio-composites. *Mater Lett*, 2007, 61, 1839-44.
- LIU X, NIEBUR GL. Toxicity of single-walled carbon nanotube: How we were wrong? *Biomech Model Mechanobiol*, 2008, 7, 335-44.
- LIVERNEAUX P. Utilisation d'un ciment phosphocalcique dans le traitement de la dysplasie fibreuse des os : à propos d'un cas. *Revue Chir Orthop*, 2003, 89, 532-6.
- LIVERNEAUX P. Augmentation expérimentale de la résistance du radius distal ostéoporotique par un ciment phosphocalcique. *Chir Main*, 2004, 23, 37-44.
- LORENTZON R, ALFREDSON H, HILDINGSSON C. Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1998, 6, 202-8.
- LOUBET F, FISZMAN M. Les cellules souches embryonnaires : un modèle cellulaire pour l'étude de la différenciation cardiaque normale et pathologique. *Médecine/Sciences*, 1998, 14, 1072-6.
- MAHEU E. L'acide hyaluronique dans le traitement de la gonarthrose. *Maîtrise orthopédique*, 2000, 95.
- MAC ALINDON TE, LAVALLEY MP, GULIN JP, FELSON DT. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis : a systematic quality assessment and meta-analysis. *JAMA*, 2000, 283, 1469-75.
- MACHOLAN M. The mouse skull as a source of morphometric data for phylogeny inference. *Zoologischer Anzeiger*, 2008, 247, 315-327.
- MAINARD D, GOUIN F, CHAUVEAUX D, ROSSET P, SCHWARTZ C. *Les substitues de l'os, du cartilage et du ménisque en 2011*. Monographie éditée par la SOFROT et sous l'égide de la SOFCOT, Romillat Eds, 2011, p 9.
- MANKANI MH, KUZNETSOV SA, WOLFE RM, MARSHALL GW, GEHRON ROBEY P. *In vivo* bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem cells*, 2006, 24, 2140-214.
- MASQUELET AC, BEGUE T. The concept of induced membrane for reconstruction of long



- bone defects. *Orthop Clin North Am*, 2010, 41, 27-37.
- MASTERSON S, LIDDER S, SCOTT G. Impaction femoral allografting at revision hip arthroplasty. *Bone Joint Surg Br*, 2012, 94, 51-5.
- MATTHEWS JA, WNECK GE, SIMPSON DG, BOWLIN GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromol*, 2002, 3, 232-8.
- MEARS DC. Metals in medicine and surgery. *Int Met Rev*, 1977, 22, 119-55.
- MEJDOUBI E, LACOUT JL, HEUGHRBAERT, MICHAUD P. Optimization of hydraulic calcium phosphate cement. *Advanced Materials Research*, 1994, 1, 163-72.
- MULLER J, HUAUX F, FONSECA A, NAGY JB, MOREAU N, DELOS M, RAYMUNDO-PINERO E, BEGUIN F, KIRSCH-VOLDERS M, FENOGLIO I, FUBINI B, LISON D. Structural Defects Play a Major Role in the Acute Lung Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes: Toxicological Aspects. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21, 1698-1709.
- MUTHASWAMU L, ZHENG Y, VAJTAI R, SHEHKAWAT G, AJAYAN P, GEER RE. Variation of radial elasticity in multiwalled carbon nanotubes. *Nano Lett*, 2007, 7, 3891-4.
- NAKAMURA I, JIMI E. Role of  $\alpha_v\beta_3$  integrins in osteoclast function. *Recent Res develop Immunology*, 2004, 6, 79-94.
- NARITA N, KOBAYASHI Y, NAKAMURA H, MAEDA K, ISHIHARA A, MIZOGUCHI T, USUI Y, AOKI K, SIMIZU M, KATO H, OZAWA H, UDAGAWA N, ENDO M, TAKAHASHI N, SAITO N. Multiwalled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. *Nano Lett*, 2009, 9, 1406-13.
- NIU L, KUA H, CHUA DHC. Bonelike apatite formation utilizing carbon nanotubes as template. *Langmuir*, 2010, 26, 4069-73.
- OBERT L, LEPAGE D, SERGENT P, ROCHET S, GALLINET D, TROPET Y, GARBUIO P. Post-traumatic malunion of the distal radius treated with autologous costal graft: technical note on seven cases. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2011, 97, 430-7.
- OBERT L, COUESMES A, BARNOUIN L. Industrial approach in developing an advanced therapy product for bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*, 2010, 4, 194-204.
- OBERT L, LEPAGE D, PAUCHOT J, TROPET Y. Consolidation osseuse et pseudarthrose des os longs : l'apport des BMP. *E-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie*, 2007, 6, 24-30.
- PATHAK S, SWADENER JG, KALIDINDI SR, COURTLNAD HW, JEPSEN KJ, GOLDMAN HV. Measuring the dynamic mechanical response of hydrated mouse bone by nanoindentation. *Mech Behav Biomed Mater*, 2011, 4, 34-43.
- PELISSIER P, VILLARS F, MATHOULIN-PELISSIER S, BAREILLE R, LAFAGE-

- PROUST MH, VILAMITJANA-AMEDEE J. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats. *Plast Reconstr Su.*, 2003, 111, 1932-41.
- PICARD C, LAVALLE P, HUBERT P, CUISINIER FJG, DECHER G, SCHAAF P, VOEGEL JC. Buildup mechanism for poly(l-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir*, 2001, 17, 7414-24.
- PIEDRA M, GARCIA-UNZUETA MT, BERJA A, PAULE B, LAVIN BA, VALERO C, RIANCHO JA, AMADO JA. Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density. *BMC Med Genet*, 2011, 12, 168.
- PITT CG, GRATZEL MM, KIMMEL GL. Aliphatic polyesters 2. The degradation of poly(DL-lactide), poly( $\epsilon$ -caprolactone) and their copolymers *in vivo*. *Biomaterials*, 1981, 2, 215-20.
- PRATO M, BIANCO A. Can CNTs be Considered Useful Tools for Biological Applications? *Adv Mater*, 2003, 15, 1765-68.
- PRATO M, KOSTARELOS K, BIANCO A, PANTAROTTO D, SINGH R, PASTORIN G, KLUMPP C, LACERDA L. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103, 3357-62.
- PREININGER C, CLAUSEN-SCHAUMANN H, AHLUWALIA A, DE ROSSI D. Characterization of IgG langluir-Blodgett films immobilized on funcioalized polymers. *Talanta*, 2000, 52, 921-30.
- PRICE RL, WAID MC, HABERSTROH KM, WEBSTER TJ. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials*, 2003, 24, 1877-87.
- PHILIPS BW, BELMONTE N, VERNOCHET C, AILHAUD G, DANI C. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Com*, 2001, 284, 478-84.
- PUJOL JP. *Le cartilage, Atlas de l'arthrose*. Lequesne, Menkès Eds, Negma, 1995, p 12.
- QUARTO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, KUTEPOV SM, MUKHACHEV V, LAVROUKOV A, KON E, MARCACCI M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 2001, 344, 385-6.
- RADIN EL, ROSE RM. Role of the subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clinical Orthopedics and Eelated Research*, 1986, 213, 150-61.
- RAVI KUMAR MNV. A review of chitin and chitosan applications. *Reac Funct Polym*, 46, 1-27.
- REN HX, CHEN X, LIU JH, GU N, HUNAG XJ. Toxicity of single-walled carbon nanotube: How we were wrong? *Mater Today*, 2010, 13, 6-8.
- REN K, JI J, SHEN J. Construction and enzymatic degradation of multulayer poly-l-lysine/DNA films. *Biomaterials*, 2006, 27, 1152-59.

- RENEKER DH, CHUN I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnol*, 1996, 7, 216-23.
- RESNICK JL, BIXLER LS, CHENG L, DONOVAN PJ. Longterm proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 1992, 359, 550-1.
- RHO JY, ROY ME 2<sup>nd</sup>, TSUI TY, PHARR GM. Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation. *J Biomed Mater Res*, 1999, 45, 48-54.
- RICHERT L, LAVALLE P, PAYAN E, SHU XZ, PRESTWICH GD, STOLTZ JF, SCHAAF P, VOEGEL JC, PICART C. Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir*, 2004, 20, 448-58.
- RIBOT C. Traitement hormonal et ostéoporose postménopausique. *Rev Rhue*, 2006, 73, 812-16.
- RINAUDO M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*, 31, 603-32.
- ROBERT H. Chondral repair of the knee joint using mosaicplasty. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2011, 97, 418-29.
- ROY ME, RHO JY, TSUI TY, EVANS ND, PHARR GM. Mechanical and morphological variation of the human lumbar vertebral cortical and trabecular bone. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44, 191-7.
- RYPACEK F. structure-to-function relationships in the biodegradation of poly(aminoacid)s. *Polym Degrad Stab*, 1998, 59, 345-51.
- RYSER HJP, SHEN WC. Conjugaison of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, 75, 3867-70.
- SAKAGUCHI N, WATARI F, YOKOYAMA A, NODASAKA Y. High-resolution electron microscopy of multi-wall carbon nanotubes in the subcutaneous tissue of rats. *J Electron Microscop*, 2008, 57, 156-64.
- SAMUEL RE, SHUKLA A, PAIK DH, WANG MX, FANG JC, SCHMIDT DJ, HAMMOND T. Osteoconductive protamine-based polyelectrolyte multilayer functionalized surfaces. *Biomaterials*, 2011, 32, 7491-502.
- SANCHEZ-SOTELO J, MINUERA L, MADERO R. Treatment of fractures of the distal radius with a remodelable bone cement: a prospective, randomised study using Norian SRS. *J Bone Joint Surg Br*, 2000, 856-63.
- SCHARVOGEL M, WINKELMUELLER W. Metal injection of titanium for medical and aerospace applications. *J Mater*, 2011, 63, 94-6.
- SARMA B, RAVI CHANDRAN KS. Recent advances in surface hardening of titanium. *J Mater*, 2011, 63, 85-92.

- SATO K, SUZUKI I, ANZAI J. Preparation of polyelectrolyte-layered assemblies containing cyclodextrin and their binding properties. *Langmuir*, 2003, 19, 7406-12.
- SAW KY, ANZ A, MERICAN S, TAY YG, RAGAVANAIDU K, JEE CS, MC GUIRE DA. Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood progenitor cells and hyaluronic acid after arthroscopic subchondral drilling: a report of 5 cases with histology. *Arthroscopy*, 2011, 27, 493-506.
- SAW KY, HUSSIN P, LOKE SC, AZAM M, CHEN HC, TAY YG, LOW S, WALLIN KL, RAGAVANOIDU K. Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic Acid: an experimental study in a goat model. *Arthroscopy*, 2009, 25, 1391-400.
- SCHULTZ P, VAUTIER D, RICHERT L, JESSEL N, HAÏKEL Y, SCHAAF P, VOEGEL JC, OGIER J, DEBRY C. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, a-MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials*, 2005, 26, 2621-30.
- SEOL YJ, LEE JY, PARK YJ, LEE YM, KU Y, RHYU IC, LEE SJ, HAN SB, CHUNG CP. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett*, 2004, 26, 1037-41.
- SINGH R, PANTAROTTO D, LACERDA L, PASTORIN G, KLUMPP C, PRATO M, BIANCO A, KOSTARELOS K. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 3357-62.
- SUDA T, JIMI E, NAKAMURA I, TAKAHASHI N. Role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast differentiation and function. *Methods Enzymol*, 1997, 282, 223-35.
- SMITH CM, STONE AL, PARKHILL RL, STEWART RL, SIMPKINS MW, KACHURIN AM, WARREN WL, WILLIAMS SK. Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue Eng*, 2004, 10, 1566-76.
- TAYLOR G. Disintegration of water drops in an electric field. *Proc R Soc*, 1964, 280, 33-97.
- THIERRY B, KUJAWA P, TKACZYK C, WINNIK FM, BILODEAU L, TABRIZIAN M. Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayers. *J Am Chem Soc*, 2006, 127, 1626-7.
- THOMAS T, BREUIL V, BRIOT K. Les biphosphonates oraux dans le traitement de l'ostéoporose postménopausique. *Rev Rhue*, 2006, 73, 817-827.
- TROIANI HE, MIKI-YOSHIDA M, CAMACHO-BRAGADO GA, MARQUES MAL, RUBIO A, ASCENCIO JA, JOSE-YACAMAN M. Direct observations of the mechanical properties of single-walled carbon nanotubes and their junctions at atomic level. *Nano Lett*, 2003, 3, 751-5.
- TROJANI C, BALAGUER T, BOUKHECHBA F, CARLE GF, BOILEAU P, ROCHET N. Inventaire des stratégies cellulaires en ingénierie tissulaire de reconstruction osseuse. *Rev Chir Orthop*, 2008, 94, 1-11.

- TROPET Y, LEPAGE D, GALLINET D, OBERT L, GARBUIO P, VICHARD P. Articular reconstructions by a costochondral grafting (or osteochondral costal grafting). *Bull Acad Natl Med*, 2006, 190, 1439-56; discussion 1456-7, 1475-7.
- TRYOHEN-TOTH P, VAUTIER D, HAIKEL Y, VOEGEL JC, SCHAAF P, OGIER J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mat res*, 2002, 60, 657-667.
- URIST MR. *Fundamental and clinical bone physiology*, Lippincott Eds, Philadelphia, 1980, p 412- 416.
- URIST MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, 150, 893-9.
- USUI Y, AOKI K, NARITA N, MURAKAMI N, NAKAMURA I, NAKAMURA K, ISHIGAKI N, YAMAZAKI H, HORIUCHI H, KATO H, TARUTA S, KIM YA, ENDO M, SAITO N. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. *Small*, 2008, 4, 240-24.
- VANDAMME K, HOLY X, BENSIDHOUM M, LOGEART-AVRAMOGLU D, NAERT IE, DOUYCK JA, PETITE H. *In vivo* molecular evidence of delayed titanium implant osseointegration in compromised bone. *Biomaterials*, 2011, 32, 3547-54.
- VERSIER G, LE COADOU PY. Résultats de l'expérience multicentrique SFA des auto-greffes osteochondrales en mosaïque. *Annales de la SFA 1999*, Sauramps Montpellier Eds, 2000, p 239-251.
- VODOUHE C, SCHMITTBUHL M, BOULMEDAIS F, BAGANRD D, VAUTIER D, SCHAAF P, VOEGEL JC, OGIER J. Effect of functionalization of polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*, 2006, 27, 4149-56.
- WANG J, SHAW LL. Nanocrystalline hydroxyapatite with simultaneous enhancements in hardness and toughness. *Biomaterials*, 2009, 30, 6565-72.
- WANG X, PADTURE NP, TANAKA H. Contact-damage-resistant ceramic/single-wall carbon nanotubes and ceramic/graphite composites. *Nat Mater*, 2004, 3, 539-44.
- WANG Y, DE ISLA N, HUSELSTEIN C, WANG B, NETTER P, STOLTZ JF, MULLER S. Effect of alginate culture and mechanical stimulation on cartilaginous matrix synthesis of rat dedifferentiated chondrocytes. *Biomed Mater Eng*, 2008, 18(1 Suppl), 547-54.
- YAN S, LEONG KF, DU Z, CHUA CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*, 2001, 7, 679-89.
- YU LG, KHOR KA, LI H, CHEANG P. Effect of spark plasma sintering on microstructure and in vitro behavior of plasma sprayed HA coatings. *Biomaterials* 2003, 24, 2695-705.
- YU MF, LOURIE O, DYER MJ, MOLONI K, KELLY TF, ROUFF RS. Strength and breaking mechanism of multiwalled carbon nanotubes under tensile load. *Science*, 2000, 287, 637-40.

- ZANELLO LP, ZHAO B, HI H, HADDON RC. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett*, 2006 , 3, 562-67.
- ZAPPATERRA T, OBERT L, LEPAGE D, ROCHET S, GALLINET D, TROPET Y. Post-traumatic reconstruction of digital joints by costal cartilage grafting: a preliminary prospective study. *Chir Main*, 2010, 29, 294-300.
- ZELENY J. Instability of electrified liquid surface. *Phys Rev*, 1917, 10, 1-6.
- ZELLER V, DESPLACES N. Antibiothérapie des infections ostéoarticulaires à pyogènes chez l'adulte : principes et modalités. *Rev Rhum*, 2006, 73, 183-90.
- ZHAN GD, KUNTZ JD, WAN J, MUHKERJEE AK. Single-wall carbon nanotubes as attractive toughening agents in alumina-based nanocomposites. *Nat Mater*, 2003, 2, 38-42.
- ZHANG YZ, OUYANG H, LIM CT, RAMAKHRISHNA S, HUANG ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffold. *J Biomed Mater Res Part B*, 2005, 72, 156-65.
- ZHANG X, KOVTUN A, MENDOZA-PALOMARES C, OULAD-ABDELGHANI M, FIORETTI F, RINCHENBACH S, MAINARD D, EPPLE M, BENKIRANE-JESSEL N. SiRNA-loaded multi-shell nanoparticles incorporated into a multilayered film s a reservoir for gene silencing. *Biomaterials*, 2010, 31, 6013-8.
- ZUR NIEDEN NI, KEMPKA G, AHR JH. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized. *Differentiation*, 2003, 71, 18-27.

## **ANNEXES**



## **I - Matériel et méthodes**

## I.1 Préparation des implants en titane nanorenforcés

Deux types d'implants constitués d'un alliage titane Ti-6Al-4V ont été conçus :

- (i) des billes (de diamètre 1 mm) pour une implantation chez la souris,
- (ii) des cylindres (longueur de 10 mm et diamètre de 2,5 mm) pour une implantation chez le rat.

Un premier groupe d'implants en alliage titane (10 billes et 3 cylindres) n'a pas été fonctionnalisé à leur surface et constitue ainsi le groupe témoin sans recouvrement plasma. Deux autres groupes d'implants ont été traités et recouverts à leur surface par la technique de projection thermique à plasma chaud (Balani *et al*, 2007), technique approuvée par la FDA pour le recouvrement en surface des implants orthopédiques (Campbell, 2003). La projection thermique a été réalisée avec un pistolet de type SG (Short Gun) 100 gun, de la compagnie Praxair Surface Technology (Danbury, Connecticut, USA) à une puissance de 23 kWatts (Figure 28).

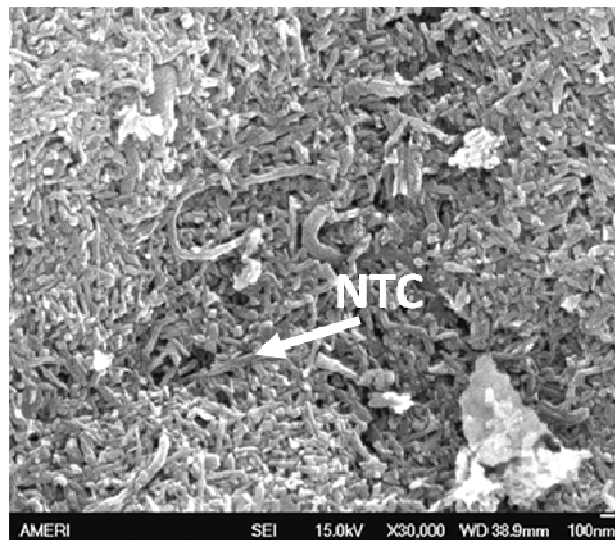


**Figure 28 : Pistolet utilisé pour réaliser le revêtement par technique de projection thermique à chaud des implants en alliage de titane des groupes 2 & 3**

Le second groupe d'implants (10 billes et 3 cylindres) en alliage de titane a été fonctionnalisé avec recouvrement en surface d'HA (épaisseur de la couche déposée d'environ 100-150 microns). Le troisième groupe d'implants (10 billes et 3 cylindres) en alliage titane a été fonctionnalisé par un dépôt de poudre sèche constitué d'HA et de NTC (à une concentration de 4 %). La poudre avant projection, a été mélangée par ultrasonication (Figure 29) pendant 90 minutes dans une solution d'acétone. Puis la poudre a été ensuite séchée dans un incubateur à 75 °C pendant 48 heures. Elle a été analysée par microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure 30) afin de s'assurer de l'homogénéité du mélange et de l'absence d'agrégats de NTC.



**Figure 29 : Technique d'ultrasonication pour mélanger les poudres d'HA et de NTC**



**Figure 30 : Observation en MEB de CNT après utilisation de la technique d'ultrasonication dans la poudre d'HA**

## **I.2 Préparation des capsules nanofonctionnalisées avec 2 facteurs de croissance**

### ***(i) Incorporation des facteurs de croissance***

Durant cette étude nous avons choisi BMP-<sub>2</sub> et TGF-β<sub>1</sub> comme facteurs de croissance incorporés dans le film de multicouches de polyélectrolytes de la capsule. Les différentes architectures suivantes ont été préparées :

- capsules « témoin négatif » : (P<sub>LL</sub>-P<sub>lGA</sub>)<sub>5</sub>-P<sub>LL</sub>
- capsules actives : (P<sub>LL</sub>-P<sub>lGA</sub>)<sub>5</sub>-P<sub>LL</sub>-BMP<sub>2</sub>-P<sub>LL</sub>-TGFβ<sub>1</sub>-P<sub>LL</sub>

Pour la formation des capsules fonctionnalisées, des particules de silice d'1  $\mu\text{m}$  ou 3  $\mu\text{m}$  ont été enrobées par la technique de dépôt de film de multicouches avec 5 paires de couches de polyélectrolytes constituées de: PLL, Poly-( $\ell$ -lysine) hydrobromide (PLL, P.M=30.3 KDa), et de PLGA, acide Poly-glutamique (PLGA, P.M=47,5 KDa). Une première couche de PEI (polyéthylèneimine) a été déposée suivie d'un dépôt de polypeptides et de protéines suivant l'ordre : PG(PLL-PLGA)<sub>5</sub>-PLL-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta$ <sub>1</sub>-PLL. A un volume de 100  $\mu\text{L}$ , les capsules se terminant en PLL ont été incubées une nuit à 4° C avec 0.2  $\mu\text{g/mL}$  de BMP-2. Après un lavage avec du MES, une couche de PLL a été adsorbée pendant 20 min, suivi de 3 cycles de lavage par MES. Enfin le facteur TGF- $\beta$ 1 [0.2  $\mu\text{g/mL}$ ] a été déposé durant une nuit en incubation à 4°C. Les capsules ont été lavées deux fois, pour ôter le surplus de protéines et une nouvelle fois incubées avec une dernière couche de PLL pour favoriser l'attachement cellulaire. Enfin les noyaux de silice ont été dissous par addition de 5 M d'acide fluorhydrique et les capsules formées ont été lavées 4 fois avec 50 mM de MES à pH 5.5.

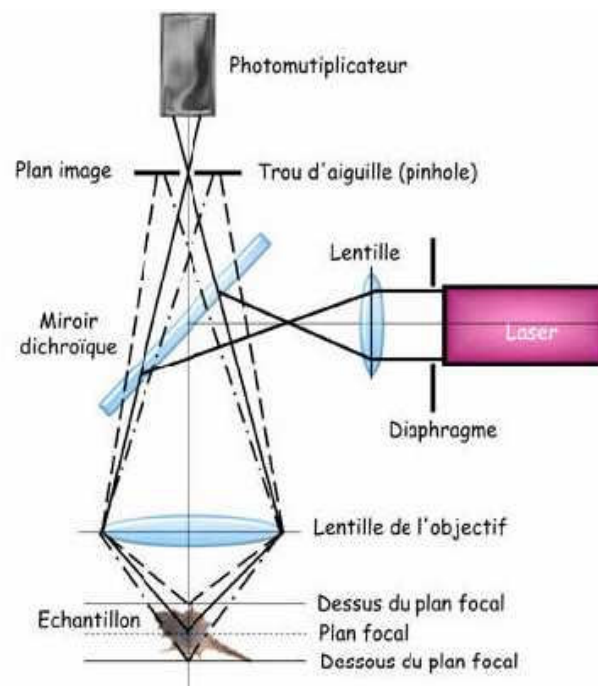
### **(ii) Microscopie confocale à balayage laser**

La technique de microscopie confocale à fluorescence a été utilisée pour vérifier la bonne construction des films sur les particules. Pour les visualiser elles ont été marquées à l'aide de fluorophores couplés aux polyélectrolytes (PLL<sup>FITC</sup>). Les images ont été prises avec le microscope Leica TSC SP2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Un laser a permis d'exciter les électrons des capsules marquées. Ceux-ci reviennent à leur état fondamental en émettant un rayonnement lumineux que l'on a pu mesurer.

La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un photon, puis à le réémettre à une longueur d'onde plus élevée. Soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état vibronique excité. A température ambiante, la conversion interne entraîne une perte partielle de l'énergie absorbée et la molécule se retrouve dans un état d'énergie excité moins élevé. Le retour de la molécule à son état stable est associé à l'émission d'un photon d'énergie inférieure à celui du photon absorbé.

La spécificité de la microscopie confocale à balayage laser est qu'elle permet d'obtenir une image précise d'un point focal. Le principe général a été proposé par Minsky en 1957. Il s'agit de diriger une lumière ponctuelle, généralement obtenue à partir d'un laser, sur un point précis (point focal) de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal.

Pour éliminer cette fluorescence parasite, un trou de filtrage (pinhole) (Figure 31), est placé en amont du détecteur pour ne laisser passer que la lumière en provenance du point focal. Le balayage de l'échantillon en XY par le laser fournit une image du plan focal. Pour le balayage en Z, l'objectif est monté sur un moteur pas à pas. Il est ainsi possible d'obtenir des images en provenance de différents plans focaux et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions. Cette technique a été particulièrement intéressante pour étudier et comparer la structure normale de nos capsules multicouches fluorescentes.



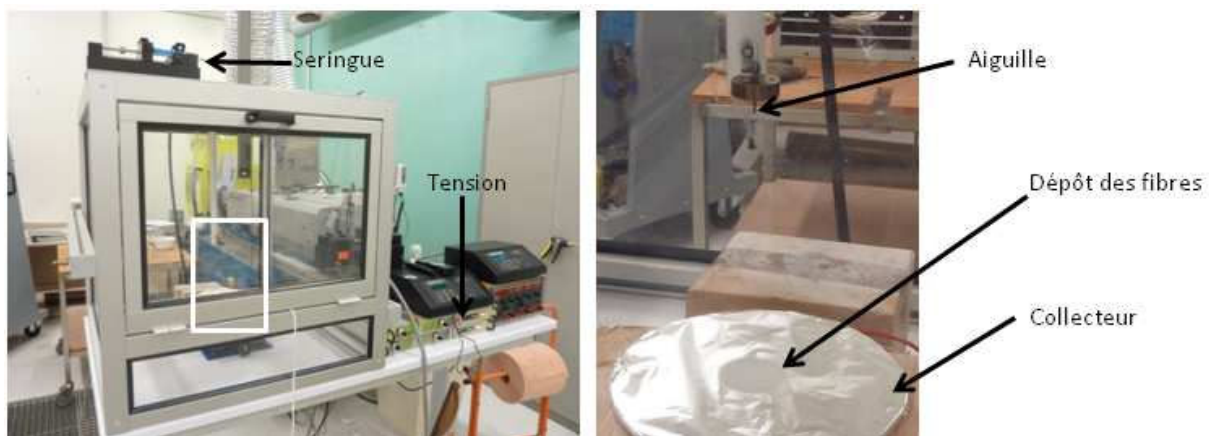
**Figure 31 : Principe de fonctionnement du microscope confocal**

### **I.3 Préparation des membranes nanofibreuses**

#### **(i) Electrofilage**

Les membranes nanofibreuses ont été synthétisées au laboratoire de l'École de Chimie et Physique de Strasbourg. Les membranes sont constituées de poly-ε-caprolactone, 17 gramme de PCL de masse molaire 80 000 g/mol dans 100 ml de solvant, le solvant est constitué de diméthylformamide (DMF) et de dichlorométhane (DCM). Le poly-ε-caprolactone (PCL) provient de chez Sigma-Aldrich, ainsi les 2 solvants utilisés, à savoir : tétrahydrofurane (DCM) et diméthylformamide (DMF). Nous utilisons un mélange DCM/DMF (50/50) (vol/vol) avec une distance de déposition de 25 cm. Le débit des solutions de polymère a été fixé à 2 mL/H.

La déposition des nanofibres s'est faite par électro-filage ou *electrospinning*. La machine d'electrospinning est composée d'une alimentation haute-tension Heizinger 0-20 kV (Allemagne), d'un pousse-seringue et de seringues en verre de 10 mL (VWR, France). Le tuyau, connectant la seringue à l'aiguille de déposition, est un tuyau classique de transport de gaz. Nous utilisons une aiguille 19 G dont l'extrémité pointue a été limée puis poncée afin d'obtenir un cylindre creux. Un bras en matière plastique, dont une des extrémités est percée afin de pouvoir y insérer l'aiguille, a été utilisé afin de pouvoir régler la distance de déposition. Le collecteur est constitué d'une plaque conductrice recouverte d'une feuille (120 x 120 mm<sup>2</sup>) d'aluminium (Figures 32).

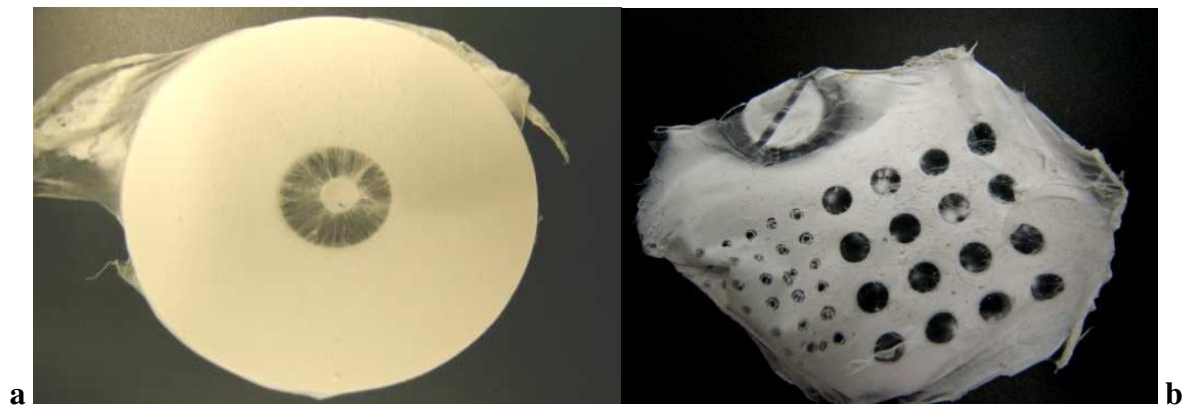


**Figure 32 : Machine d'electrospinning, aiguille et collecteur**

La haute-tension est appliquée en connectant le câble haute-tension à l'aiguille et au collecteur à l'aide de pinces crocodiles. La tension appliquée est fixée à 15 kV pour les solutions dans DCM/DMF. La déposition s'effectue sous sorbonne afin de prévenir les éventuels arcs électriques et afin d'aspirer les solvants s'évaporant pendant la déposition. Toutefois, pour ne pas porter atteinte à la stabilité du procédé, la ventilation de la sorbonne n'est pas enclenchée, l'aspiration des solvants se faisant par la ventilation résiduelle, ce qui est suffisant étant donné le faible débit de la solution de polymère. Une fois la membrane obtenue, des disques de la taille souhaitée sont découpés (Figures 33).

Les membranes nanofibreuses ont ensuite été fonctionnalisées par le système de multicouches (LbL), afin d'obtenir l'architecture suivante (DGL<sup>G5</sup>-BMP-2)<sub>n</sub>. La technique a été effectuée par simple immersion alternative durant 15 minutes dans une solution de 300 µL

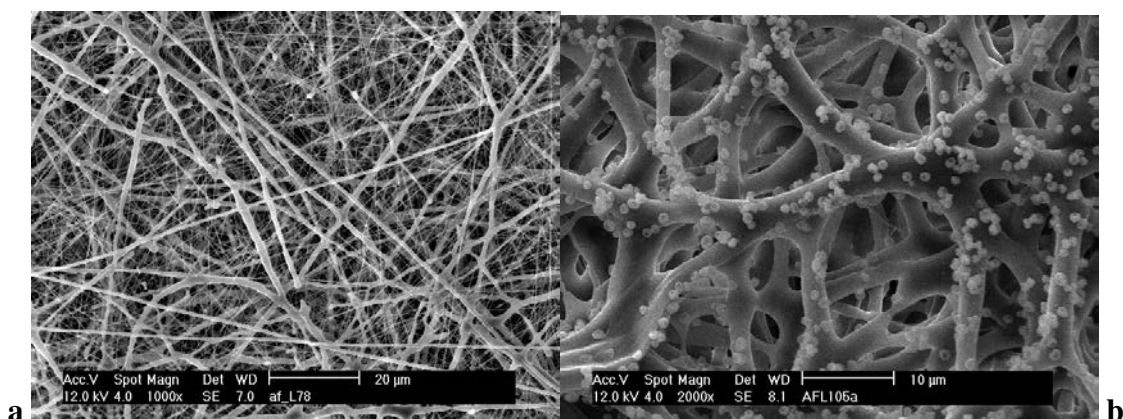




**Figures 33 : Membrane de PCL obtenue électrofilage (a), coupe au diamètre souhaité (b)**

de DGL et 300  $\mu$ L de BMP-2, à des concentrations respectives de 50  $\mu$ M pour DGL<sup>G5</sup> et 200 nM pour BMP-2, en présence de 0,04 M de MES et 0,15 M de NaCl à pH 5.5. Entre chaque dépôt de couche, la membrane a été rincée avec cette même solution de 0,04 M de MES et 0,15 M de NaCl à pH 5.5. Toutes les membranes ont été stérilisées aux UV dans une solution de 1 mL de sérum physiologique durant 30 minutes avant de débiter la culture cellulaire.

L'observation morphologique des membranes par microscopie électronique à balayage (MEB) des membranes a été ensuite réalisée. Une couche d'or-palladium est déposée sur les membranes préalablement à leur observation. Un microscope Cambridge J210S, à une tension d'accélération de 20 kV, a été utilisé pour ces observations. Le diamètre des fibres et la visualisation des nanoréservoirs a été vérifiée à partir des clichés obtenus pendant les séances d'observation (Figures 34).



**Figure 34 : Observation au grossissement X 1000 au MEB : des fibres déposées sur les membranes de PCL (a) et des nanoréservoirs obtenus sur les membranes (b)**



**(ii) Caractérisation de la morphologie des membranes par MEB**

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique qui permet de visualiser la morphologie de la surface des matériaux pour une résolution pouvant aller jusqu'à quelques nanomètres. L'appareil est composé d'un canon à électrons, d'une colonne électronique, d'une platine porte-objet, d'un détecteur et d'une pompe à vide. Le canon à électrons correspond à la source du faisceau d'électrons. Après sollicitation par ce faisceau d'électrons, l'échantillon réémet des électrons secondaires qui sont détectés et analysés. Pour que l'échantillon puisse évacuer les charges dues au faisceau d'électron, il doit être conducteur. Il est donc nécessaire de le recouvrir d'une fine couche conductrice, ce principe est nommé « métallisation ». Les observations ont été effectuées par un MEB XL-ESEM, Philips.

Les échantillons à observer sont collés sur un porte-objet grâce à un ruban adhésif double face carboné conducteur. Ils sont ensuite métallisés par le dépôt d'une couche or/palladium par pulvérisation cathodique sous vide sous argon grâce au métalliseur Technics, Hummer JR 50Hz, 220V, 7A muni d'une pompe Alcatel Elnor. Après la métallisation, les échantillons sont laissés 1h sous vide pour qu'ils soient secs. Le diamètre des fibres est mesuré à partir des images MEB, 20 mesures sont effectuées par membrane.

**(i) Dépôt des multicouches sur les membranes nanofibreuses**

Avant d'effectuer les dépôts de polyélectrolytes sur les membranes préalablement électrospinnées, il est nécessaire de les découper avec un emporte pièce, afin d'obtenir une surface identique pour chaque échantillon. Chaque membrane découpée est ensuite maintenue au fond d'un puits d'une plaque de 24 puits à l'aide d'un insert. Ceci évite que la membrane ne se replie sur elle-même durant les dépôts. Le diamètre effectif des membranes positionnées dans les puits des plaques 24, est de 15 mm, ainsi la surface est de 177 mm<sup>2</sup>. Chaque puit contenant la membrane avec l'insert est rempli de 2 mL de solution tampon laissée 1h avant le début de l'expérience. Cette solution est remplacée par 300 µL d'une solution de polycation durant 15 min puis l'étape de rinçage est effectuée avec 2 mL de solution tampon durant 15 min. 300 µL d'une solution de polyanion est alors ajoutée, l'incubation dure 15 min. Une étape de rinçage durant 15 min par la solution de tampon est alors effectuée. Une bicouche est ainsi constituée en 1h. Ce procédé est suivi jusqu'à ce qu'on atteigne le nombre de bicouches souhaité.

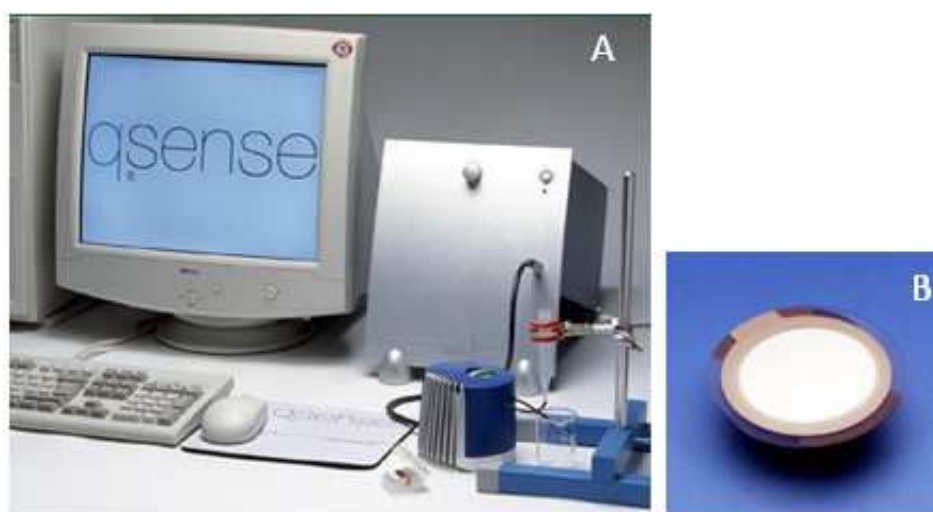
#### **I.4 Dépôt des multicouches sur le cristal de quartz et caractérisation de la formation des multicouches par QCM-D**

La microbalance à cristal de quartz avec mesure du facteur de dissipation (QCM-D) permet de suivre la construction du film multicouche en temps réel. Cette technique nous permet d'avoir une idée des propriétés viscoélastiques du film multicouche et de calculer l'épaisseur et la masse hydratée moyenne de chaque couche en utilisant les modèles adaptés.

##### ***(i) Appareillage***

La QCM-D provient de l'entreprise suédoise Q-Sense. Elle correspond au modèle Q-Sense D301. Le dispositif consiste en une chambre de mesure thermostatée connectée à une unité électronique qui est elle-même reliée à un ordinateur (Figure 35A). L'acquisition des données est effectuée grâce au logiciel « Q-soft » qui nous permet de suivre en temps réel l'évolution des fréquences et des facteurs de dissipation.

Le cristal de quartz utilisé est de type QSX 303, son diamètre effectif est de 10 mm, ainsi la surface est de 78,5 mm<sup>2</sup>. Sa face supérieure est recouverte d'une couche de 50 nm d'épaisseur de dioxyde de silicium (Figure 35B). Une électrode en or est positionnée sur chaque face du cristal. Il possède une fréquence de résonance fondamentale de 5 MHz et 3 fréquences harmoniques de 15, 25 et 35 MHz. Les fréquences de résonance sont mesurées avec une précision de 1 Hz. Le cristal est disposé dans la chambre de mesure dans laquelle chaque solution de polyélectrolytes ou de tampon est ajoutée.



**Figures 35 : Dispositif de QCM D Q-sense type D301 (A), Cristal de quartz (B)**

##### ***(ii) Principe de la QCM***

La technique de la QCM a été développée dans les années 60 par Sauerbrey. Elle utilise les propriétés piézoélectriques du cristal pour quantifier la masse adsorbée sur celui-ci.

Tout ajout ou perte de masse sur le cristal entraîne une variation de la fréquence de résonance qui est reliée directement à la variation de masse selon la loi de Sauerbrey :

$$\Delta m = -\frac{\rho_q t_q \Delta f}{n f_0}$$

Où  $f_0$  est la fréquence de résonance intrinsèque du cristal de quartz,  $\rho_q$  sa densité,  $t_q$  son épaisseur et  $n$  le rapport entre la fréquence de l'harmonique et la fréquence fondamentale.

Les paramètres propres au cristal utilisé peuvent être réunis dans une constante notée  $C$ , la relation de Sauerbrey est ainsi simplifiée par l'équation :

$$\Delta m = -C \Delta f$$

Pour les cristaux de quartz utilisés,  $C$  est égal à 17,7 ng/cm<sup>2</sup>Hz.

Le cristal peut résonner à sa fréquence fondamentale, notée  $f_0$ , qui est de 5 MHz mais aussi à toutes ses harmoniques impaires notées  $n$  (3, 5 et 7 dans notre cas). La fréquence

fondamentale est reliée à ses harmoniques par la relation  $\Delta f = \frac{\Delta f_n}{n}$ .

Ainsi, la relation de Sauerbrey devient :

$$\Delta m = \frac{-C \Delta f_n}{n}$$

Pour ces fréquences, la sensibilité de la technique est améliorée mais leur longueur de pénétration diminue avec l'augmentation de la fréquence.

En connaissant la densité effective du film  $\rho_{eff}$ , il est possible d'estimer l'épaisseur du dépôt effectué noté  $d_{est}$  par la relation :

$$d_{est} = \frac{\Delta m}{\rho_{eff}}$$

Dans notre cas,  $\rho_{eff} = 1,1$  kg/L.

La relation de Sauerbrey s'applique pour un dépôt en contact avec le vide. De façon approchée, elle peut être utilisée pour les dépôts solides au contact d'un liquide seulement pour des films fins rigides. Dans de nombreuses situations et notamment les films construits à partir de polymères naturels, les films sont très hydratés. Dans ces conditions, cette relation ne s'applique plus. Un film très hydraté, mou, amortira l'oscillation du cristal, ce qui correspond à un phénomène de dissipation. Dans ce cas, la masse déposée calculée avec la relation de Sauerbrey sera sous-estimée.

Afin de prendre en compte les propriétés viscoélastiques de ces films mous, la

microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation (QCM-D) a été développée. Elle fait intervenir le facteur de dissipation noté  $D$  qui est inversement proportionnel au temps caractéristique d'amortissement des oscillations du cristal après son excitation. Le modèle permet de déterminer grâce à la QCM-D, l'évolution de l'épaisseur du film mou et d'estimer ses propriétés viscoélastiques. Ainsi la QCM-D nous permet de vérifier la construction couche par couche des films multicouches de polyélectrolytes, de quantifier la masse et l'épaisseur de chaque couche déposée et d'estimer la viscosité et le module élastique des films.

### (iii) Protocole expérimental

Avant chaque expérience, le cristal est nettoyé *in situ* avec une solution alcaline d'Hellmanex®II à 2% dans l'eau distillée pendant 30 minutes, rincé à l'eau distillée, puis une solution d'HCl à 0.1M est mise en contact avec le cristal pendant 10 minutes. La chambre est ensuite rincée à l'eau distillée 3 fois puis 2 fois avec la solution tampon qui sera utilisée pour le rinçage lors de la construction du film multicouche. Avant de débiter la construction du film multicouche, il faut attendre la stabilisation du signal, c'est pourquoi la solution tampon est laissée 30 minutes dans la chambre. La température de la chambre est régulée à 25°C pour toutes les expériences, toutes les solutions utilisées pour la construction des films multicouches sont laissées au bain-marie à 25°C pendant la durée de l'expérience. L'expérience débute par une injection de 500 µL de tampon dans la chambre, la solution est laissée 5 minutes en contact avec le cristal. 300 µL de solution de polycations sont ensuite injectés et laissés 6 minutes en contact avec le cristal. L'étape de rinçage avec la solution tampon est répétée puis 300 µL de solution de polyanions sont mis en contact avec le cristal durant 6 minutes. Une bicouche est ainsi construite. Ces différentes étapes sont répétées jusqu' au dépôt de 6 bicouches. Après chaque expérience, le cristal est nettoyé en suivant le même protocole.

## I.5 Culture cellulaire

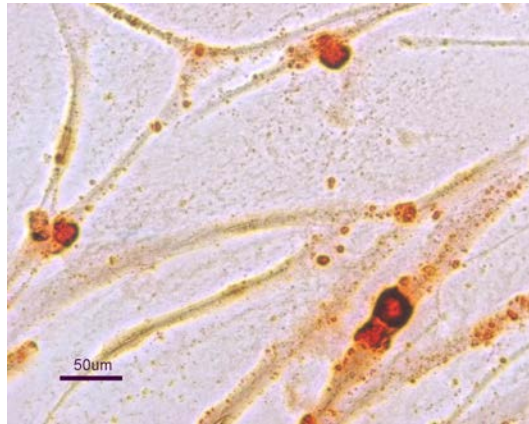
### (i) Culture d'ostéoblastes humains prélevés

Après information quant à l'utilisation des déchets opératoires à des fins de recherche, un consentement éclairé est recueilli sur un formulaire auprès du patient. Les fragments d'os spongieux de taille 2 x 3 mm ont été prélevés soit sur une tête fémorale réséquée soit sur un greffon d'os iliaque. Ces explants osseux ont été ensuite collectés dans des tubes de 25 mL

contenant du milieu de culture cellulaire stérile, milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant des antibiotiques à 5 % (streptomycine à 100µg/mL et pénicilline à 100 UI/mL (Gibco), puis transportés rapidement au laboratoire à 4° C. Après réception au laboratoire, une fiche de traçabilité a été remplie et les prélèvements traités. Après 3 lavages au PBS dans un tube stérile pour éliminer les cellules fibroblastiques, on a immergé les fragments dans une solution de PBS plus gélatinase à concentration de 50 µg/L et laissé agir l'enzyme au bain-marie à 37° C pendant 1 heure. Puis le milieu est aspiré, on relave à 3 reprises avec une solution de PBS.

Les explants osseux ont été ensuite étalés dans une boîte à Pétri de 1 cm<sup>2</sup> et recouverts au ¾ d'une solution de milieu de culture composée de DMEM, les antibiotiques (à 5%) et supplémentée en sérum bovin fœtal (FBS) à 10%. Ils sont alors placés à l'incubateur à CO<sub>2</sub> à 37°C durant 15 à 21 jours, avec un changement de milieu tous les 5 jours. Les ostéoblastes vont se détacher de l'explant osseux et proliférer sur le fond de la boîte de culture. Ces cellules ostéoblastiques sont ensuite détachées de la boîte par un traitement à la trypsine-EDTA à 0,5 %, récupérées dans un tube stérile pour être culottées par centrifugation, puis lavées au PBS, recentrifugées, et à nouveau suspendues dans le milieu de culture pour comptage sur lame de Neubauer sous microscope. Elles sont alorsensemencées dans des boîtes de culture de surface plus grande (25 cm<sup>2</sup> puis 75 cm<sup>2</sup>). Lorsque les ostéoblastes sont à confluence, ils sont détachées par la trypsine-EDTA, lavées au PBS, comptées et prêtes pour les expériences à réaliser.

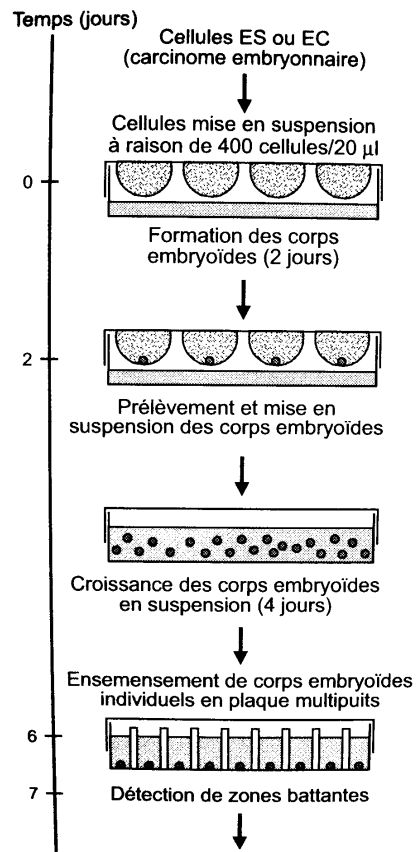
Pour s'assurer que nos ostéoblastes humains obtenus sont capables de synthétiser les constituants de la MEC, des oséoblastes ont été mis en culture 25 jours sur une plaque 6 puits, afin de réaliser un test de mise en évidence de la synthèse de cristaux de calcium phosphate. Une solution d'alizarine rouge (à 1%) a été préparée juste avant emploi, on a dissout 0,1g de poudre d'alizarine rouge dans 10 mL de PBS, filtré et gardé à l'obscurité à 4°C. Le test a été réalisé à J0, J10 et J25. Après avoir aspiré les milieux et lavé au PBS 2 fois les puits concernés, on a ajouté 2-3 mL d'éthanol absolu à 70 % (gardé à - 20°C), et mis la plaque à 4°C durant 10 min. On a ensuite aspiré l'alcool, lavé les puits au PBS, 2 à 3 fois, aspiré et ajouté 1 mL d'alizarine rouge à 1%, dans chaque puit, puis laissé agir 1 min 30, à température ambiante au noir, avant d'aspirer le milieu, et de laisser sécher 24 heures. Les observations au microscope optique ont permis de vérifier la présence de précipitations rouges (cristaux de calcium phosphate synthétisés) (à J10 et J25) (Figure 36).



**Figure 36 : Observation à J10 en MO (grossissement X40) de précipités de cristaux de calcium phosphate**

**(ii) Cellules souches embryonnaires murines et obtention des corps embryoides**

Des cellules souches embryonnaires de souris de la lignée D3 (données par A. Dierich, IGBMC, Strasbourg), ont été gardées au stade indifférencié (Zur Nieden *et al*, 2003), avant d'obtenir des corps embryonnaires qui eux peuvent se différencier en lignée ostéoblastique. Pour induire une différenciation des ES, on a cultivé les cellules selon le système de « gouttes pendantes » sur plaque retournée (Figure 37). Dans une première étape, on prélève une goutte de 20 µL de milieu de culture contenant 1000 cellules ES qui sont déposées sur la face interne du couvercle d'une plaque qui est ensuite remis en position normale. Au bout de 48 heures, les cellules se sont rassemblées au fond de la goutte, les ES se sont agrégées et ont formé un corps embryotaire (EB). Ces EB sont maintenus en suspension entre les jours J3 et J5 dans une boîte à « adhérence ultra-lente » pour leur permettre de continuer leur développement avec un lieu de culture supplémenté en insuline [1 µg/mL], acide ascorbique [50 µg/mL] et FBS à 20%. Enfin, les EB sont prélevés individuellement et ensemencés sur lamelles dans des plaques 4 ou 24 puits. Ils vont alors adhérer à la surface, la différenciation cellulaire va se poursuivre et les premières zones battantes peuvent généralement être détectées le même jour. Les EB différenciés peuvent être maintenus en l'état pendant de très nombreux jours mais on peut aussi repérer les zones battantes, les disséquer sous une loupe binoculaire, et dissocier les cellules à l'aide d'un traitement à la collagénase. On va alors observer les effets des capsules fonctionnalisées par les facteurs de croissance : BMP-2 [10 ng/mL] et TGF-β<sub>1</sub> [2 ng/mL] sur la différenciation en ostéoblastes. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.



**Figure 37 : Schéma du protocole de différenciation des cellules souches embryonnaires par la technique « gouttes pendantes » sur plaque retournée (Loubet *et al*, 1998).**

**(iii) Obtention des lignées chondrocytaires humains**

Le milieu de culture des chondrocytes humains a été composé de :

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 (DMEM), Gibco, France
- Serum bovin foetal (SBF) 10% (vol/vol), Gibco, France
- Pénicilline (100 U/mL) Gibco, France
- Streptomycine (100 µg/mL), Gibco, France
- Fungizone (2,5 µg/mL), Gibco, France
- L-glutamine (4 et 2 mM), Gibco, France
- Sodium Pyruvate (10 mM), Gibco, France
- Acide ascorbique (150 µg/mL), Sigma-Aldrich, France

Les chondrocytes humains de la lignée HCH de chez Promocell, France, ont été décongelés et mis en culture dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> contenant du milieu complet (DMEM/F12 supplémenté par 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL streptomycine) contenant 10% de SBF.



## **I.6 Implantations chez l'animal**

### **(i) Réglementation de l'expérimentation animale**

Toutes les procédures pour nos études de soins, d'anesthésie, d'opérations, de surveillance et d'euthanasie au sein de l'animalerie, sur les animaux se sont déroulées selon le livre de bord d'expérimentation animale de la Faculté de Médecine de Strasbourg, la réglementation en cours du code rural et les règles de Bioéthique. L'animalerie a été inspectée régulièrement par les services vétérinaires pour vérifier le bon respect du déroulement des protocoles d'études, le Dr Benkirane-Jessel ayant une autorisation émanant de la préfecture du Bas-Rhin et l'agrément de la direction des services vétérinaires.

### **(ii) Protocole opératoire d'implantation et explantation des implants titane**

Les animaux étaient des rongeurs installés dans une animalerie thermorégulée ( $24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ), dont l'air est renouvelé et dans laquelle des cycles diurnes (6 à 18 heures) et nocturnes (18 à 6 heures) alternent régulièrement. Les souris sont placées par six dans des cages en plastique et les rats par deux, avec accès à une nourriture standardisée et de l'eau ad libitum. Les expérimentations ont débuté après une période d'acclimatation des animaux d'une durée de deux semaines. Au total ont été utilisés pour notre étude *in vivo* :

- 17 souris mâles de la lignée ICR (Imprinting Control Region) de chez Charles River (Saint-Germain sur Arbresle, France) qui pesaient alors entre 46 à 54 grammes et étaient âgées de 12 semaines,

- 6 rats mâles Wistar de chez Charles River (Saint-Germain sur Arbresle, France) qui pesaient alors entre 520 à 630 grammes et étaient âgés de 17 semaines.

Le protocole d'anesthésie a consisté : pour les souris, anesthésie intra-péritonéale avec un mélange de kétamine (75 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) et pour les rats, sédation par xylazine 0,2 mL puis anesthésie intra-péritonéale avec un mélange de kétamine (75 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg). Une fois l'animal anesthésié, après avoir rasé la partie latérale du genou droit, il est installé en decubitus ventral, sur table chauffante, le membre inférieur droit maintenu par du ruban adhésif en rotation externe et abduction. Dans de strictes conditions d'aseptie et sous grossissement binoculaire, la peau est incisée, puis la patella et le tendon quadricipital réclinés et luxés en médial en un bloc avec l'aide d'une spatule. Le périoste du tiers inférieur du fémur est incisé. Un trou de trépan est réalisé à l'aide d'une fraise électrique sous irrigation continue, au niveau du condyle latéral d'un diamètre de 1 mm sur les fémurs de souris et de 3 mm sur les fémurs de rats. Puis à travers le défaut osseux ainsi

réalisé, sont introduits les divers implants : billes pour les souris et cylindres pour les rats. Les implants chez la souris sont introduits en position métaphysaire et chez le rat sont poussés jusqu'en position centro-médullaire. L'unité patella-tendon quadricipital est simplement repositionnée sans suture. Après lavage au sérum physiologique, la peau est fermée sans drainage par 3 points non résorbables de fil Ethilon® 4/0. L'animal est surveillé jusqu'à son réveil et on vérifie son aptitude à se déplacer.

La répartition des divers implants a été effectuée selon le tableau 3. Chaque animal n'a reçu qu'un seul type d'implant, afin d'éviter toute interférence entre les implants. Un total de 17 billes a été implanté sur les souris et de 6 cylindres sur les rats. Sur certains animaux un trou de trépan est réalisé sans implantation, ils constituent le groupe 4, groupe témoin.

**Tableau 3 : Répartition des implants titane selon 4 groupes**

	Souris	Rats
Groupe 1 (Titane nu)	6 billes	2 cylindres
Groupe 2 (HA)	4 billes	2 cylindres
Groupe 3 (HA- 4 wt.% CNT)	7 billes	2 cylindres
Groupe 4 (trépan sans implant)	4 trépan	2 trépan

La surveillance clinique des animaux a été effectuée de façon hebdomadaire, pendant un mois sur tous les animaux à la recherche des signes d'infection. Sur le membre inférieur droit, a été observé la cicatrice, la mobilité du genou, une éventuelle gêne lors de la marche. Une variation de poids, de comportement, ou d'habitudes alimentaires des rongeurs a aussi été notée.

L'explantation des implants a lieu au bout d'un mois d'implantation. Les rongeurs ont été sédatisés par de la kétamine puis sacrifiés avec des doses léthales de kétamine. Pour les différentes analyses *ex vivo*, la totalité de l'os fémoral, de la tête fémorale à l'articulation du genou comprise, a été prélevée avec excision des tissus fibreux attenants. Les pièces opératoires ont été fixées dans un premier temps dans une solution de formaldéhyde à 20%.

**(iii) Protocole opératoire d'implantation et d'extraction des implants avec capsules**

La solution d'alginate (alfa Aesar) à basse viscosité a été préparée à 1 % w/w dans de l'eau Milli-Q Ultrapure (Water System, Millipore, 18.2 MΩ cm) et portée à pH 7,4 pour permettre l'ionisation des groupements carboxyliques de ses chaînes (la présence de calcium

induit la transition liquide – gel). La solution de chlorure de calcium (Sigma) a été préparée à 0,05 M. Différents échantillons de capsules (fonctionnalisées ou non) ont d’abord été incubés dans le gel d’alginate (utilisé comme substrat pour l’implantation *in vivo*), mis en culture 5 jours avant implantation sous-cutanée sur souris MF1-nu/nu. Dans le gel implanté, dans lequel seront ajoutées nos EB, la concentration en capsules était de 1000 capsules par EB.

Des souris de la lignée MF1 –nu/nu ont été utilisées pour l’implantation de nos capsules dans le gel d’alginate. Dix souris mâles ont été achetées chez Harlan et acclimatées pendant au minimum une semaine dans l’animalerie avant d’entamer l’expérimentation. Agées de 4-5 semaines, elles pesaient 28 à 32 semaines.

Dans un premier temps, les souris ont été anesthésiées au pentothal, et les différentes capsules avec gel d’alginate ont été introduites en position sous-cutanée dorsale en regard de la région cervicale. Dans un second temps, après une incubation *in vivo* de 4 semaines, les souris ont été euthanasiées, pour procéder à l’extraction de l’implant et du tissu sous-cutané.

***(iv) Protocole opératoire d’implantation et d’extraction des membranes***

Certaines membranes (implants 3) ont été implantées en position sous-cutanée avec des ostéoblastes au sein d’un lattis de collagène I (qui réalisait une matrice 3D). La solution de collagène de type I acido-soluble de 3mg/ml dans de l’acide acétique à 0,1% (Institut Jacques Boy, Reims) est issue de la queue de rat. Après neutralisation par de la soude, le collagène polymérise et forme un gel renfermant les cellules ajoutées juste avant cette polymérisation. Les gels sont coulés dans des boîtes de Pétri de 5cm de diamètre à raison de 5 ml par boîte et de  $1.5 \cdot 10^5$  cellules (Bell *et al*, 1979). Les composants nécessaires à la réalisation du lattis de collagène sont résumés dans le tableau 4. Le milieu de culture est remplacé par du milieu DMEM 10% SVF tous les 7 jours.

**Tableau 4 : Composition d’un lattis de collagène**

Composants	Quantité
1- Solution DMEM (+20% de SVF)	2,75 ml
2- Collagène (3mg/ml)	1,5 ml
3- NaOH (0,1N)	0,25 ml
4- Suspension cellulaire	0,5 ml
Concentration $3 \cdot 10^5$ /ml	$1.5 \cdot 10^5$ cellules

Certaines membranes (implants 4) ont été implantées en position sous-cutanée avec des chondrocytes au sein d'une solution d'alginate (qui réalisait une matrice 3D). La solution d'alginate (alfa Aesar) à basse viscosité a été préparée à 1 % w/w dans de l'eau Milli-Q Ultrapure (Water System, Millipore, 18.2 MΩ cm) et portée à pH 7,4 pour permettre l'ionisation des groupements carboxyliques de ses chaînes (la présence de calcium induit la transition liquide – gel). La solution de chlorure de calcium (Sigma) a été préparée à 0,05 M. Les membranes ont d'abord été incubés dans le gel d'alginate (utilisé comme substrat pour l'implantation *in vivo*), mis en culture 5 jours avant implantation sous-cutanée.

Les animaux étaient des rongeurs installés dans une animalerie thermorégulée (24 °C ± 1 °C), dont l'air est renouvelé et dans laquelle des cycles diurnes (6 à 18 heures) et nocturnes (18 à 6 heures) alternent régulièrement. Les souris sont placées par six dans des cages en plastique avec accès à une nourriture standardisée et de l'eau ad libitum. Les expérimentations ont débuté après une période d'acclimatation des animaux d'une durée de deux semaines. Au total ont été utilisés pour notre étude *in vivo* : 30 souris mâles nude de la lignée SWISS de chez Janvier (France), qui pesaient alors entre 30 à 32 grammes et étaient âgées de 5 à 6 semaines.

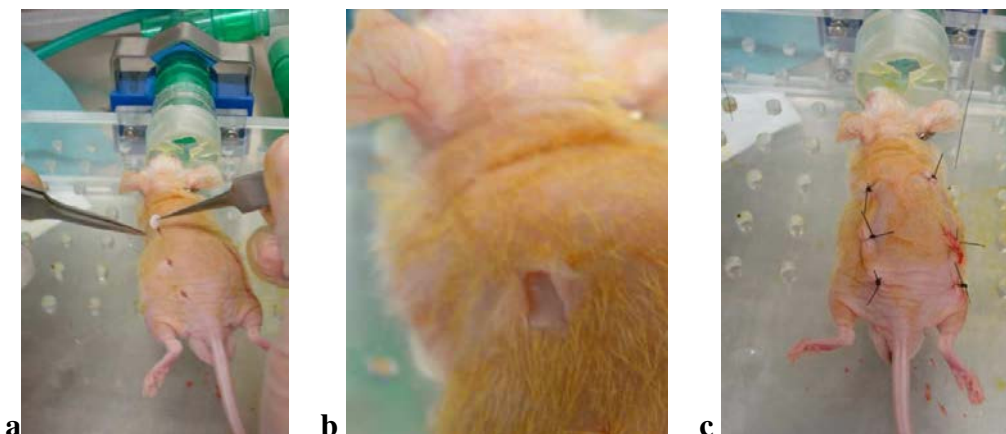
Le protocole d'anesthésie volatile a consisté en 2 temps avec une induction dans une chambre d'induction à un débit de 500-1000 L/min et à une concentration de 5 %, puis un entretien au masque de l'anesthésie à un débit de 100-200 L/min et à une concentration de 1-3 %, en fonction des signes de tolérance et de conscience de l'animal. Une analgésie complémentaire a pu être obtenue par instillation locale au niveau du site opératoire de xylocaïne non adrénalinée (anesthésique local) pendant l'intervention (palier 2 de douleurs prévisibles pour implantations sous-cutanées et palier 3 de douleurs prévisibles pour implantations intra-osseuses).

Une partie des membranes ont été implantées en position *in situ* dans de l'os (en position *calvaria*). La technique consiste à réaliser 2 trépan dans le crâne sur l'os frontal de 1 mm de diamètre. On travaille sous loupes grossissantes, l'animal installé en décubitus ventral sur tapis chauffant, après désinfection à la bétadine, on réalise : une incision cutanée médiane du scalp, un décollement de médial en latéral du périoste, un fraisage des 2 trépan en prenant soin de ne pas léser la dure-mère (Figure 38a), puis l'implantation de deux membranes identiques (cellules vers le haut) et suture au périoste par 2 points d'Ethilon® 10/0 (Figure 38b) et une fermeture de la peau avec des points séparés d'Ethilon® 4/0 après lavage.



**Figures 38 : Fraisage des 2 trépan (a), implantation de la membrane et suture au périoste par 2 points d’Ethilon® 10/0 (b)**

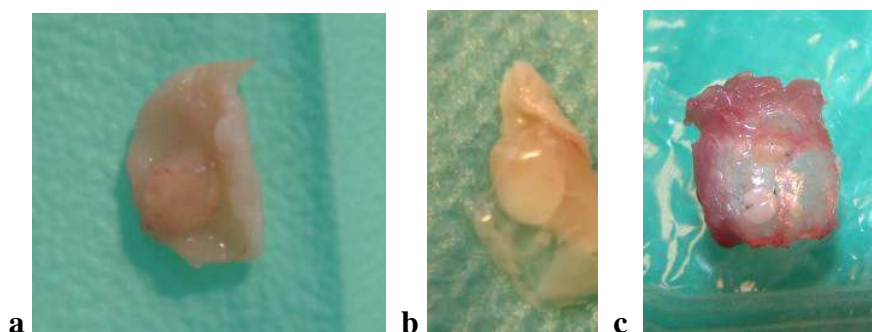
Une partie des membranes a été implantée en position *ex situ*, *id est* en position sous-cutanée dorsale de part et d’autre du rachis. Six membranes au maximum (le côté avec cellules vers la peau) ont été introduites en position sous-cutanée, après une incision de 5 mm, et un décollement sous-cutané. La peau a été suturée au fil Ethilon® 4/0 (Figures 39).



**Figures 39 : Incision (a), implantation de la membrane (b) et suture cutanée par des points séparés d’Ethilon® 4/0 (c)**

La surveillance post-opératoire immédiate a duré 30 minutes. Si l’animal ne présentait pas de signes de gravité (hypothermie, tachycardie, collapsus cardio-vasculaire, patte ischémique de couleur blanche, mydriase, myosis...), de stress, de douleurs, de pertes sanguines importantes et pouvait déambuler normalement, la cage de l’animal était remise dans le local destiné. L’animal a été nourri et pu boire normalement dès son retour en salle d’hébergement. L’état général, l’appétit, la perte de poids et le comportement furent observés par le personnel de l’animalerie quotidiennement, ainsi que l’état de la cicatrice (à la recherche d’infection, désunion de plaie, ou d’apparition d’une tumeur) de façon hebdomadaire.

Dans un second temps, après une incubation *in vivo* de 4 ou 8 semaines, les souris ont été euthanasiées, pour procéder à l'extraction de l'implant crânien ou sous-cutané (Figures 40) pour analyses.



**Figure 40 : Membranes et peau en sous-cutané (a et b), membranes type calvaria (c)**

**Tableau 5 : Liste des différents types de membranes implantées**

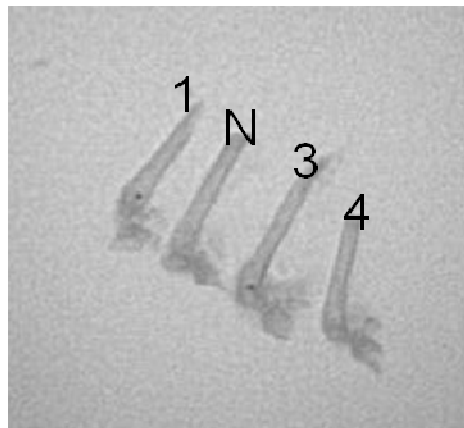
	Calvaria	Sous-cutané
Implant 0 (membrane E) : implant contrôle	4 membranes	8 membranes
Implant 1 (membrane A) : implant 0 + ostéoblastes	6 membranes	20 membranes
Implant 2 (membrane B) : membrane/BMP-2 + ostéoblastes	6 membranes	22 membranes
Implant 3 (membrane C) : implant 2 + mix collagène-ostéoblastes)	6 membranes	24 membranes
Implant 4 (membrane D) : implant 3 + mix alginate-chondrocytes	6 membranes	24 membranes

## I.7 Méthodes d'analyse des explants titane

### (i) Observations macroscopiques et radiographiques des implants en titane

L'aspect macroscopique des pièces opératoires est noté et comparé *ex vivo* après explantation des fémurs droits dans les groupes 1, 2, 3 et 4. On a recherché systématiquement la présence de signes de surinfection (liquide louche, abcès, tissus inflammatoires), l'absence de migration du matériel en dehors du fémur et la bonne fermeture du périoste et l'os cortical, où a été réalisé le point d'introduction de l'implant.

L'analyse radiographique des fémurs *ex vivo* a été effectuée de façon comparative de face et de profil par fluoroscopie entre les fémurs droits du groupe 1 (implants titane), du groupe 2 (implants titane recouverts d'HA), du groupe 3 (implants composites recouverts d'HA et de NTC), du groupe 4 (trépan sans implant) et le groupe N (fémur normal non opéré) (Figure 41). Il a été noté la position de l'implant (intra- ou extra-osseux), recherché des signes d'infection (appositions périostées, destruction osseuse) et des signes de bonne ostéointégration de l'implant (absence de liseré d'ostéolyse autour des implants).



**Figure 41 : Radiographie comparative des fémurs de souris : bille en titane groupe 1 (1), fémur normal groupe N (N), bille en titane composite HA-NTC groupe 3 (3), trou trépan seul sans implant groupe 4 (4)**

L'analyse macroscopique des coupes a été réalisée après un premier temps de nettoyage des pièces opératoires (ablation de la synoviale, du tissu fibreux et du périoste autour des fémurs) puis section par une scie rotative de coupes d'une épaisseur de 1 et 2 mm. Pour les fémurs de souris, la bille a dû être retirée avant cette étape, car son caractère sphérique et sa petite taille, faisaient que la bille était éjectée par la lame de section. Par contre, pour les cylindres implantés dans les fémurs de rats, une lame diamant à faible vitesse permettant de couper le titane et l'os en même temps a été utilisée (Figure 42a). En effet, les cylindres ne pouvaient pas être retirés du fait de leur ostéointégration et l'analyse du module d'élasticité a été facilitée par le plan (implant - os à distance – os au contact de l'implant). Sur les coupes de section, macroscopiquement a été recherché la fermeture de l'os cortical et du périoste autour de l'implant, des signes d'intégration osseuse (impossibilité de retirer l'implant par pression) et l'absence de surinfection (Figure 42b). Toutes les coupes de fémurs de souris et de rats (os et implants) d'épaisseur 1 et 2 mm ont été fixées dans un premier temps dans une solution de formaldéhyde à 20%.





**Figures 42 : Section par lame diamant à faible vitesse d'un fémur de rat (a) et analyse macroscopique d'une coupe de section os-implant titane (b)**

***(ii) La nanoindentation***

La nanoindentation est une technique permettant l'évaluation de la dureté et du module d'élasticité d'un matériau par l'enfoncement d'une pointe (indenteur). La mesure par nanoindentation nécessite d'appliquer et de contrôler des charges aussi faibles que quelques dizaines de micro-Newtons ( $\mu\text{N}$ ) (Bec *et al*, 1995). L'avantage de l'instrument de nanoindentation est sa capacité à mesurer avec une résolution nanométrique, la profondeur de pénétration allant jusqu'à quelques micromètres. Les indentations à cette échelle, permettent d'évaluer les propriétés mécaniques des films ou couches minces, sans qu'elles soient influencées par le substrat (dans notre cas le titane). La dureté H (Hardness) et le module d'élasticité E, sont déduits de l'analyse des courbes charge-déplacement (P-h) (Figure 43) en se référant aux équations suivantes (Rho *et al*, 1999) :

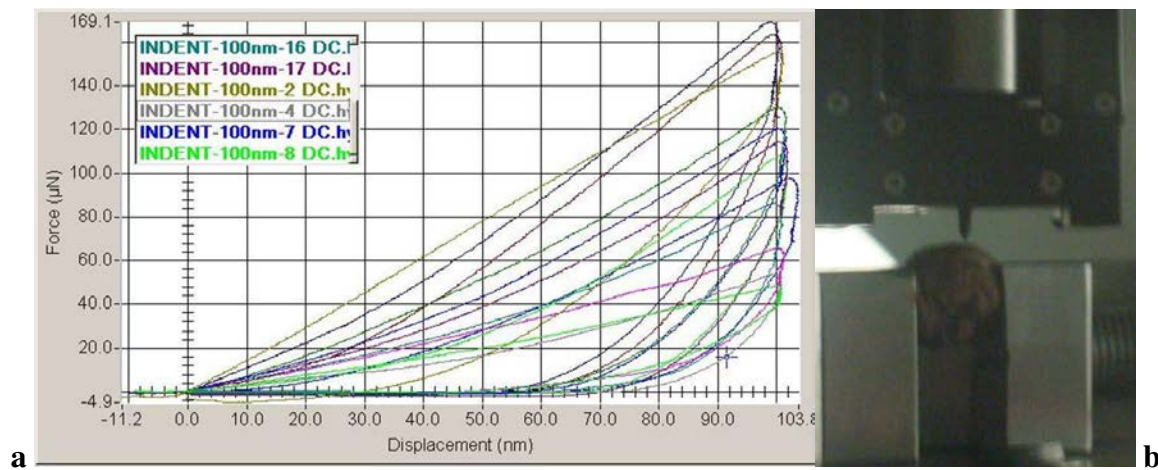
$$H = AP_{\max}$$

$$E_r = AS2\pi$$

$$\frac{1}{E^r} = \frac{(1 - \nu^2)}{E} + \frac{(1 - \nu_i^2)}{E^i}$$

où  $P_{\max}$  la charge maximale d'indentation, h le déplacement de la pointe ou de l'indenteur, A l'aire du contact projeté, S ( $dP/dh$ ) est la raideur de contact,  $\nu$  le coefficient de Poisson du

matériau indenté et  $E_r$  son module d'élasticité réduit, compte tenu du fait que la rigidité de l'indenteur n'est pas infinie.  $E_i$  et  $\nu_i$  sont respectivement le module d'élasticité ( $E_i = 1017$  GPa) et le coefficient de Poisson ( $\nu_i = 0,07$ ) de l'indenteur. Une table X-Y à commande numérique est employée pour positionner avec précision l'indenteur, la distance de l'indenteur au microscope optique (MO) étant calibrée. La dureté et le module d'élasticité sont déterminés à partir de la courbe de déchargement. La courbe de chargement est caractéristique de la réponse élastoplastique du matériau. En allégeant graduellement la charge (phase de déchargement), il se produit que le déplacement, qui a lieu lors du retrait de l'indenteur, est en première approximation, accommodé élastiquement par le matériau. Cela permet d'évaluer le module élastique (E) et la dureté (H).



**Figures 43: Courbes charge-décharge typiques par nanoindentation (a), réalisées sur un os de souris type *calvaria* (b)**

L'obtention du module élastique (E) par nanoindentation a été effectuée sur les coupes semi-fines de 1-2 mm provenant de fémurs de rats. L'implant n'a pas été retiré et cela a permis de réaliser les tests au niveau de l'interface entre, au total 4 zones différentes : le substrat (l'implant en titane), le coating (couche d'HA ou d'HA + NTC), l'os néoformé autour de l'implant et l'os naturel à distance de l'implant. Le repérage de ces zones se faisant à l'aide du MO.

Les coupes ont été retirées de leur solution de formaldéhyde pendant la durée de la nanoindentation (Pathak *et al*, 2011). Pour préparer la surface des échantillons, les coupes de section ont été polies avec un chiffon humide sans particules abrasives (les particules abrasives pouvant s'incruster dans l'os et modifier ainsi ses propriétés mécaniques). Le nanoindenteur (Hysitron®) (Figure 44) était équipé d'une pointe en diamant de Berkovich de rayon 100 nm

et de forme pyramidale à base triangulaire. Les charges statiques et dynamiques utilisées pour les mesures étaient respectivement de 3  $\mu\text{N}$  et 1.5  $\mu\text{N}$ , avec une fréquence appliquée de 200 Hz. Pendant les mesures, les échantillons osseux ont été maintenus hydratés par adjonction régulière de formol.



**Figure 44 : Nanoindenteur Hysitron®**

La cartographie du module d'élasticité a été possible en utilisant le mode '*modulus mapping*' lors de l'analyse nanodynamique (nano DMA). Trois plans de E en 2D sur chaque région de la région 1 à la région 7, couvrant une aire totale de 5  $\mu\text{m}$  X 5  $\mu\text{m}$  à la surface des échantillons ont été réalisés (soit une matrice de 256 X 256 points, résultant de 65536 points de mesures).

**(iii) Analyses histologiques et microscopiques**

L'analyse histologique au microscope optique a été effectuée, après avoir préalablement décalcifié les échantillons (d'os de souris et de rats) dans une solution d'acide acétique à 10% pendant 4 jours et après avoir extrait les implants de type cylindre, avant une inclusion en paraffine. Des sections ultrafines de 70 nm ont été effectuées, avant de procéder à 3 types de colorations : coloration au rouge Mallory, coloration Hémalum-éosine et coloration au bleu de Toluidine. Toutes les coupes ont été observées en MO aux grossissements X5, 10, 20 et 40.

L'analyse par microscopie électronique à transmission a été effectuée après avoir fixé les échantillons dans une solution de paraformaldéhyde à 4%, après les avoir décalcifié dans une solution d'acide acétique à 10% pendant 4 jours, et extrait les implants de type cylindre. Puis les échantillons ont été fixés avec une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% dans un tampon cacodylate 0,1 M pendant 1 heure à 4 ° C, déshydratés à l'alcool et inclus dans de l'Epon 812. Des coupes ultrafines à 70 nm ont été réalisées, la prise de contraste a été réalisée

avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb, puis les coupes ont été examinées avec un microscope électronique Morgagni 268D Philips.

## **I.8 Méthodes d'analyse des capsules**

### ***(i) Suivi de la prolifération et la viabilité cellulaire***

Pour s'assurer qu'il y a bien une induction osseuse, le phénotype et le génotype des cellules différenciées, à partir des cellules souches embryonnaires ont été observés. Les cellules ont été observées au microscope optique et électronique (à balayage et à transmission) après que les échantillons aient été prélevés et fixés. Ces échantillons ont été fixés dans du milieu de fixation Karnovsky, avec du tétroxyde d'osmium à 1 % dans 0.1M de tampon de cacodylate pendant une heure à 4°C, puis déshydratés par de l'alcool et inclus dans de l'Epon 812.

Des coupes d'épaisseurs moyennes de 2 µm ont été réalisées puis colorées par du bleu de Toluidine, et analysées histologiquement en microscopie optique au grossissement X10, X20 et X40. On a observé et comparé la différenciation des corps embryonnaires en présence de gel d'alginate et de capsules fonctionnalisées ou non, avec BMP-2 et TGF-β<sub>1</sub>.

Pour la microscopie électronique à balayage (MEB), les échantillons ont été fixés, déshydratés comme au-dessus, séchés avec un appareil au point critique de séchage puis montés sur de l'aluminium, couverts avec de l'or-palladium et coupés en utilisant un «cold sputter-coater » et observés avec un microscope Philips XL-20.

Pour la microscopie électronique à transmission (MET), des coupes ultrafines à 70 nm ont été réalisées, la prise de contraste a été réalisée avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb, puis les coupes ont été examinées avec un microscope électronique Morgagni 268D Philips.

### ***(ii) Détection de la biominéralisation osseuse***

La présence de collagène I, sa taille, sa bonne quantité et son organisation sont des marqueurs du bon déroulement du processus de biominéralisation. On a observé le collagène en MET et caractérisé les fibres.

Après 21 jours de culture, les cellules différenciées des EB ont été lavées 2 fois au PBS, puis fixées deux heures à température ambiante avec un tampon neutre de formaline à 10 %. Après lavage avec dH<sub>2</sub>O, les cellules sont colorées pendant 30 minutes par du nitrate

d'argent à 2,5% (fraîchement préparé). Après 2 lavages par dH<sub>2</sub>O, les cellules sont colorées pour le comptage avec du bleu de Toluidine à 0,1 %, lavées 3 fois avec dH<sub>2</sub>O et séchées à l'air. La présence de structures minéralisées (en noir) est ensuite enregistrée par une « cool snap » caméra couplée à un microscope Leica DRBH.

**(iii) Analyse de l'expression d'ostéopontine par immunofluorescence**

Les EB dans le groupe témoin ont été différenciés sur gélatine en présence de BMP-2, TGFβ<sub>1</sub>, insuline et acide ascorbique puis fixés au 21<sup>ème</sup> jour avec du paraformaldéhyde à 2 %. Par immunocytochimie, les cellules ont été traitées avec un anticorps monoclonal de souris anti-ostéopontine (OPN [Akm2A1]: sc-21742; Santa Cruz Biotechnology), puis par un second anticorps, l'anticorps IgG anti-souris Cy3 (H+L). Les cellules sont marquées par un traitement au Hoechst [5ng.mL<sup>-1</sup>] afin de visualiser les noyaux (ADN). L'immunocoloration pour l'expression cellulaire d'ostéopontine (en rouge) est monitorée par une « cool snap » caméra couplée à un microscope Leica DRB doté d'un filtre spécifique CY3. En terme de contrôle négatif, les EB ont été aussi cultivés en présence de capsules sans facteurs de croissance incorporés.

## **I.9 Méthodes d'analyse des membranes explantées**

**(i) Mise en évidence de l'expression de protéines par immuno-marquage**

L'immuno-marquage est une technique basée sur l'utilisation d'anticorps pour localiser une protéine dans les cellules. Les cellules doivent être fixées puis perméabilisées. L'échantillon est ensuite incubé avec un anticorps primaire qui est dirigé spécifiquement contre l'antigène d'intérêt. L'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome est ensuite ajouté. Il provient d'une autre espèce que l'anticorps primaire et possède une haute affinité pour celui-ci. Après montage dans un milieu protégeant la fluorescence, l'échantillon est observé au microscope à fluorescence. Les noyaux des cellules peuvent aussi être observés au microscope à fluorescence grâce à un marquage au DAPI qui se fixe à l'ADN et qui fluoresce en bleu après avoir été éclairé en lumière violette. Un marquage à la phalloïdine couplée à un fluorochrome permet de visualiser les filaments d'actine en rouge et ainsi de délimiter le cytosquelette.

Dans la plaque de 24 puits, l'échantillon est fixé au paraformaldéhyde (PFA) à 4% (v/v) dans le PBS durant 1h dans l'incubateur, rincé 3 fois au PBS puis perméabilisé avec une solution à 0,1% (m/v) de Triton X-100/BSA 1% pendant 1h. La BSA permet de bloquer les

sites aspécifiques de l'anticorps primaire et de minimiser ainsi les interactions non spécifiques. Les échantillons sont rincés 3 fois avec le PBS. Après la fixation et la perméabilisation des cellules, l'anticorps primaire est incubé 3h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois au PBS. L'anticorps secondaire est ensuite ajouté et incubé durant 1h dans l'obscurité pour éviter la perte de fluorescence. L'échantillon est rincé au PBS puis le DAPI est ajouté à une concentration de 200 ng/mL et laissé pendant 5 min. L'échantillon est rincé 3 fois au PBS puis incubé dans le noir durant 20 min avec la phalloïdine. Après 3 rinçages au PBS, les échantillons sont montés sur lame de verre en utilisant une goutte de Vectashield. Ce milieu de montage permet de conserver la fluorescence.

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

## **II - Autres publications**





## Bone Formation Induced by Growth Factors Embedded Into the Nanostructured Particles

S. Facca<sup>1,2,†</sup>, A. Ferrand<sup>1,†</sup>, C. Mendoza-Palomares<sup>1,4</sup>, F. Perrin-Schmitt<sup>1</sup>, P. Netter<sup>3</sup>,  
D. Mainard<sup>3</sup>, P. Liverneaux<sup>2</sup>, and N. Benkirane-Jessel<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 977,  
Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France*

<sup>2</sup>*Department of Hand Surgery, Strasbourg University Hospitals,  
Achille Baumann, 67401 Illkirch Cedex, France*

<sup>3</sup>*Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Hôpital Central and UMR 7561,  
Centre National de la Recherche Scientifique-Université Henri Poincaré Nancy I,  
29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 54000 Nancy, France*

<sup>4</sup>*Université de Strasbourg (UdS), Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg, France*

Tissue engineering has merged with stem cell biotechnology with development of new sources of transplantable biomaterials for the treatment of bone tissue diseases. Bone defects are expected to benefit from this new biotechnology because of the low self-regenerating capacity of bone matrix secreting cells. The differentiation of stem cells to bone cells using bi-functionalized multilayered particles is presented. The functionalized particles are composed of poly-glutamic acid (PGA) and poly-L-lysine (PLL) with two bone growth factors (BMP-2 and TGF $\beta_1$ ) embedded into the multilayered film. The induction of bone from these bioactive particles incubated with embryonic stem cells was demonstrated *in vitro*. We report the demonstration of a multilayered particle-based delivery system for inducing bone formation *in vivo*. This new strategy is an alternative approach for *in vivo* bone formation.

**Keywords:** Bone Induction, Osteoblasts, Stem Cells, Particles, Growth Factors, Nanostructured Materials.

### 1. INTRODUCTION

New concepts are being developed for treatment of traumatic and degenerative bone diseases, including cell grafting using cells grown in biomaterials with bone growth factors<sup>1,2</sup> and stem cell technology, as a source of transplantable material. Embryonic stem (ES) cells represent a source for cell transplantation because of their multilineage differentiation potential.<sup>3</sup> Differentiation of ES cells into elements of the skeleton can be enhanced by the addition of bone growth factors.<sup>4,5,6</sup> Bone morphogenic proteins (BMPs) can regulate cartilage and bone differentiation in the body, and so can be used to initiate bone formation and growth if applied to a bone defect. However, a carrier matrix that maintains the bioactivity and regenerating action of BMPs is required to deliver the proteins to the site of defect. The most widely used carrier

matrices for BMPs are implantable collagen-based matrices. But effort has been devoted to fabrication of other structured matrices with functional properties. Polyelectrolyte multilayer (PEM) films incorporating functional proteins and other bioactive molecules can be used. PEM films are prepared by the layer by layer (LbL) deposition of interacting materials by the electrostatic interaction of oppositely charged polyelectrolytes.<sup>7</sup> Embedded active molecules into the multilayered films have been shown to retain their biological activities in many studies.<sup>8,9</sup> These supramolecular nano-architectures can be designed to exhibit specific properties by incorporation of active proteins, peptides, drugs or DNA.<sup>10–14</sup> We have shown previously that embedding BMP-2 and the transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) into the multilayered films as a planar planar system is able to drive ES cells to bone differentiation.<sup>15</sup> Proteins were embedded within a film with alternating layers of the polypeptides poly-L-lysine (PLL) and poly-L-glutamic acid (PGA) and after

\*Author to whom correspondence should be addressed.

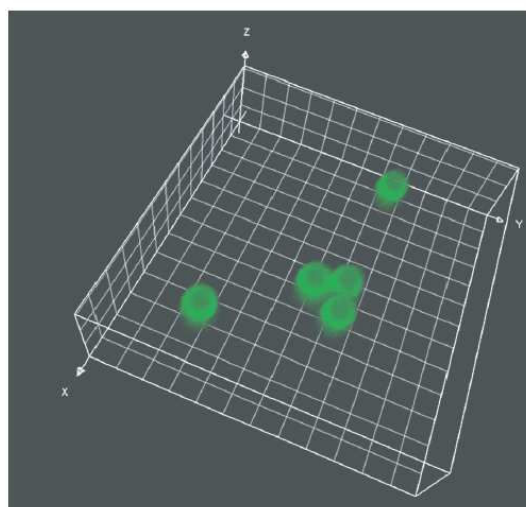
†These authors contributed equally to this work.



a local degradation of PLL/PGA films, cells gain access to biomolecules embedded within films. We have also reported recently the incorporation of these growth factors BMP-2 and TGF $\beta_1$  into the multilayered (PLL/PGA) particles/capsules (1  $\mu\text{m}$ ) (16, 17). The advantage of a colloidal system over a planar system lies in the injectable format of colloidal particles and the higher surface area. Herein, we show the preparation of multilayered particles incorporating BMP-2 and TGF $\beta_1$  and demonstrate *in vitro* and *in vivo*, the induction of bone formation from embryonic stem cells. This work shows the potential use of protein-embedded biocompatible particles in the injectable transplantation of embryonic stem cells for cell-based therapies.

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

At the first hand, we analyzed the embedding of BMP-2 and TGF $\beta_1$  within the PLL and PGA multilayer film on a planar surface using dual polarization interferometry: the deposition of BMP-2 and TGF $\beta_1$  on underlying PLL layers results in the increase in thickness and mass, which indicates the successful embedding of the proteins within the film.<sup>17</sup> At the second hand, we performed a characterization of the embedding of BMP-2 and TGF $\beta_1$  within PLL/PGA multilayers deposited on spherical colloidal templates using microelectrophoresis: the incorporation of the proteins within the multilayer was successful.<sup>17</sup> With evidence of the successful incorporation of the growth factors within PLL/PGA multilayers, particles were formed by deposition of the multilayer, with an initial layer of polyethyleneimine (PEI) on 1  $\mu\text{m}$  spherical silica particles followed by the dissolution of the silica core template using hydrofluoric acid. In Figure 1, we visualized by confocal microscopy the resulting hollow particles image with embedded growth factors. In our bone induction studies, we investigated two multilayer architectures: PEI-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL or PEI-(PGA-PLL)<sub>4</sub> as a control. To induce bone formation, embryoid bodies (EBs) were grown in contact with PEI-(PGA-PLL)<sub>2</sub>-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL multilayered particles or with PEI-(PGA-PLL)<sub>4</sub> as control. After 21 days of culture, the differentiation of the EBs, was analyzed by performing von Kossa staining. This marker clearly showed the presence of large areas of mineralized structures in the presence of BMP-2 and TGF $\beta_1$ -containing particles, whereas only sporadic black-stained areas were visible from EBs incubated with control particles. The osteogenic differentiation of ES cell-derived EBs as stimulated by BMP-2 and TGF- $\beta_1$ , indicate sufficient interaction of the EBs with the bi-functionalized particles. The presence of osteopontin secreted by osteoblasts by immunocytochemistry is another indication of the generation of osteoblasts from the EBs. The fluorescence exhibited by the cells grown in the presence of protein-embedded PLL/PGA particles demonstrates the specific



**Fig. 1.** Confocal microscopy visualization of 1  $\mu\text{m}$  fluorescently-labelled particles with shells comprising PLL<sup>FITC</sup> and PGA with embedded growth factors. The hollow cross-section of the particles is depicted.

expression of osteopontin as induced by the BMP-2 and TGF $\beta_1$  embedded in the particles.<sup>17</sup> Moreover, scanning electronic microscopy (SEM) images of the cell mass generated from growth in the presence of the particles showed the osteoblast actively producing bone matrix as well mineralized collagen fibers and cells as osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. Our results demonstrate that we are able to induce osteogenesis *in vitro* in embryonic stem cells mediated by growth factors embedded into the multilayered particles.<sup>17</sup>

Concerning *in vivo* experiment, samples tested with a subcutaneous injection of particles and EB mixed in a single formulation induced no bone formation, probably because EBs require a three-dimensional environment for growth and to increase their contact with the particles. Here, the samples were incubated in an alginate gel as substrate for the implantation. Then samples were cultured in differentiation conditions (in the presence of the active particles) for 5 days prior to subcutaneous implantation into MF1-*nu/nu* mice. As a control, we also implanted the gel-containing particles without any growth factors.

By optical microscopy, we visualized different cells of bone tissue in the sample. The observation by TEM of osteocytes into the lacuna and bony trabeculum suggests bone formation. For further characterization, we analyzed by TEM the *in vivo* induction of biomineralization by observation of calcium phosphate deposits.<sup>17</sup> As a control, by using the particles without growth factors, no hydroxyapatite crystal growth and no collagen type II, which is normally indicative of cartilage induction and then bone formation,<sup>15</sup> were detected.

Our results indicate that it is possible to induce *in vivo* bone formation by using the alginate gel as a matrix and the active multilayered particles. We have also shown that,



by using the incubated stem cells and the active particles in the alginate gel, we are able also to induce bone formation *in vitro*: which is probably due to the close proximity of the cells with particles. For the *in vivo* experiments, initial ectopic injection of the active multi-layered particles and stem cells did not result in bone induction, which suggests that the particles may be able to diffuse away from the site of injection, thus delivering a much lower concentration of the growth factors to the EBs.

By two mechanisms of local degradation and chemotaxis, cells interact with active molecules incorporated into the multilayered film.<sup>8</sup> In our system, release and delivery occurs when films are in close proximity to the cells. We have also previously shown that by only mixing BMP-2 and TGF $\beta_1$  with alginate and cells, we are not able to induce bone formation at 21 days of culture without adding the growth factors after each change of the medium. By using the particles, we did not need to add any growth factors, showing again the stability of the active molecules, when incorporated into the multilayered capsules. The nanometric size of the films allows functionalizing the systems with very few active molecules (here BMP-2 and TGF $\beta_1$ ) which are concentrated over a very small thickness.

Bi-functionalized multilayered particle-based delivery system can be used for inducing bone formation *in vivo*.

### 3. METHODS

#### 3.1. Chemicals

BMP-2 and TGF $\beta_1$  were from R&D system. Bisbenzimidazole H 33258 (Hoechst) used for microscopy were purchased from Invitrogen. Alginate sodium salt, low viscosity was purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany), and the CaCl<sub>2</sub> was from Sigma. Poly-(*l*-lysine) hydrobromide (PLL, MW = 30.3 KDa), Poly-glutamic acid (PGA, MW = 47.5 KDa), Poly-(*l*-lysine)-FITC, were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France).

#### 3.2. Embedding of BMP2 and TGF $\beta_1$ in PLL/PGA Core-Shell Particles and Capsules

Polystyrene particles (1  $\mu\text{m}$ ) were coated via LbL with 3 layers of PLL and PGA as described above and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of 50 mM MES, pH 5.5. A volume of 100  $\mu\text{L}$  of PLL-terminated particles were then incubated overnight with 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of BMP-2 at 4 °C. After washing once with MES, a layer of PLL was adsorbed for 20 min, followed by three cycles of MES washing. TGF $\beta_1$  (0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was then deposited by overnight incubation at 4 °C. The particles were washed two times to remove unbound protein and were again incubated with a final layer of PLL for enhanced cell attachment. A small volume (4  $\mu\text{L}$ ) was removed after each deposition step for zeta-potential measurement. For particle formation, silica

cores (1  $\mu\text{m}$ ) were used instead of polystyrene. An initial layer of PEI was deposited followed by the deposition of polypeptides and proteins in the following order: PGA-PLL-PGA-PLL-BMP<sub>2</sub>-PLL-TGF $\beta_1$ -PLL. The cores were dissolved by the addition of 5 M HF and the formed capsules were washed four times with 50 mM MES, pH 5.5. Confocal microscopy images of the particles were taken using a Leica TSC SP2 confocal unit (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Confocal microscopy images of the capsules were taken using a Leica TSC SP2 confocal unit (Leica Microsystems). In this study, the concentration incorporated was 0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  of BMP-2 and 0.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  of TGF $\beta_1$  after dissolution of the core of the particles, the designed particles were stored in the PBS or culture medium and visualized by confocal microscopy to show the dispersed particles.

#### 3.3. Cell Culture and Differentiation of Embryonic Stem Cells

The mouse ES cell line D3 (gift from R. Kemler) was kept undifferentiated. To induce differentiation, the ES cells, free of feeder cells by extensive plating, were cultured in hanging drops (1000 cells/30  $\mu\text{L}$ ) during 48 h in ES medium without LIF. ES medium was supplemented with insulin (1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and ascorbic acid (50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and the fetal bovine serum was increased to 20%. The formed embryoid bodies (Ebs) were maintained in suspension from day 3 to 5 into ultra-low adherent culture dishes (Stem cell technologies Inc) and then plated on coated coverslips into 4 or 24-well tissue culture plates. The effects of BMP-2 [10  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ], TGF $\beta_1$  [2  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ], in various combinations on the differentiation for osteoblasts were examined. Medium was changed every second day.

#### 3.4. Von Kossa Staining for Osteoprogenitors

The differentiated cells were washed 2 times with PBS, and then fixed 2 h at RT with 10% neutral buffered formalin. After washing with dH<sub>2</sub>O, the cells were stained 30 min. with 2.5% silver nitrate (freshly prepared). After 2 washes with dH<sub>2</sub>O, cells were counterstained 10–15 s with 0.1% toluidine blue, washed again 3 times with dH<sub>2</sub>O and air dried. The presence of mineralized structures (in black) was recorded by a cool snap camera coupled to a Leica DRBH microscope.

#### 3.5. Histological and Electron Microscopic Analysis

The samples were fixed in Karnovsky fixative, postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 hour at 4 °C, dehydrated through graded alcohol and embedded in Epon 812. Semithin sections were cut at 2  $\mu\text{m}$  and stained with toluidine blue, and histologically analysed by light microscopy. Ultrathin sections were cut



at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Philips 208 electron microscope. For scanning electron microscopy, samples were fixed, dehydrated as above, dried with critical point-drying apparatus, and then mounted on aluminium stubs coated with palladium-gold using a cold sputter-coater and observed with a Philips XL-20 microscope.

### 3.6. *In Vivo* Experiments

The samples were incubated in the alginate gel for the implantation. The alginate solution was prepared at 1% w/w in ultrapure water (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore, 18.2 M $\Omega$  cm). CaCl<sub>2</sub> solution was prepared at 0.05 M. Samples were then cultured in differentiation conditions (in the presence or the active particles) for 5 days prior to subcutaneous implantation into MF1-nu/nu mice (28–32 g, 4–5 Weeks old). For all *in vivo* studies, male MF1-nu/nu mice were purchased from Harlan and acclimatised 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 in the animals.

## 4. CONCLUSION

These findings suggest that it is possible to differentiate EBs on the multilayered particles bi-functionalized by appropriate growth factors. We present here that embedded BMP-2 and TGF $\beta$ <sub>1</sub> into multilayered particles can drive embryonic stem cells to bone differentiation not only *in vitro* but also *in vivo*.<sup>17</sup> These results indicate clearly that we are able to propose a biomaterial coated with multilayer films that interact with cells by inducing specific differentiation depending of the embedded active molecules. In order to enable the efficient repair of bone under the sub-optimal conditions found in the aged or diseased patient, we would ideally engraft populations of cells already committed to the osteogenic (bone) lineage. Our broad long-term objective is to provide combinations of osteoprogenitor cells and active scaffolds, coated by embedded growth factors, sufficient to repair large scale bone defects and to determine if viable grafts can be obtained from both ES- and derived material.

**Acknowledgments:** This work was supported by the project ANR06-BLAN-0197-01/CartilSpray, from the “Agence Nationale de la Recherche,” the “Fondation Avenir,” the “Ligue contre le Cancer, Région Alsace” and “Cancéropôle du Grand Est.” C. Mendoza-Palomares and N. Benkirane-Jessel thanks the Faculté de Chirurgie Dentaire of Strasbourg for financial support. N. Benkirane-Jessel is indebted to CHU de Nancy (Contrat d’interface vers l’hôpital).

## References and Notes

1. A. B. Oberts and M. B. Sporn, *The Transforming Growth Factor-Betas in Peptide Growth Factors and Their Receptors*, Springer Verlag, Heidelberg (1990), pp. 421–472.
2. P. Chen, J. L. Carrington, R. G. Hammonds, and A. H. Reddi, Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2P) and modulation by transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. *Exp. Cell. Res.* 195, 509 (1994).
3. J. L. Resnick, L. S. Bixler, L. Cheng, and P. J. Donova, Longterm proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550 (1992).
4. N. I. Zur Nieden, G. Kempka, and H. J. Ahr, *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 71, 18 (2003).
5. L. D. K. Buttery, S. Bourne, J. D. Xynos, H. Wood, F. J. Hughes, S. P. Hughes, V. Episkopou, and J. M. L. D. K. Polak, Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue. Engineering* 7, 89 (2001).
6. C. Hegert, J. Kramer, G. Hargus, J. Müller, K. Guan, A. M. Wobus, P. K. Müller, and J. Rohwedel, Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J. Cell. Sci.* 115, 4617 (2002).
7. G. Decher, Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277, 1232 (1997).
8. N. Jessel, F. Atalar, P. Lavalle, J. Muterrer, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel, and J. Ogier, Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv. Mater.* 15, 692 (2003).
9. N. Jessel, P. Schwinte, R. Donohue, P. Lavalle, F. Boulmedais, R. Darcy, B. Szalontai, J. C. Voegel, and J. Ogier, Pyridylamino-beta-cyclodextrin as a molecular chaperone for lipopolysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Adv. Funct. Mater.* 14, 963 (2004).
10. T. Serizawa, M. Yamaguchi, and M. Akashi, Enzymatic hydrolysis of a layer-by-layer assembly prepared from chitosan and dextran sulphate. *Macromolecules* 35, 8656 (2002).
11. K. Sato, I. Suzuki, and J. Anzai, Preparation of polyelectrolyte-layered assemblies containing cyclodextrin and their binding properties. *Langmuir* 19, 7406 (2003).
12. J. Hiller, J. D. Mendelsohn, and M. F. Rubner, Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. *Nat. Mater.* 1, 59 (2002).
13. N. Jessel, P. Schwinte, P. Falvey, R. Darcy, Y. Häikel, F. Atalar, P. Schaaf, J. C. Voegel, and J. Ogier, Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Adv. Funct. Mater.* 14, 174 (2004).
14. N. Jessel, M. Oulad-Abdelghani, F. Meyer, P. Lavalle, Y. Häikel, P. Schaaf, and J. C. Voegel, Multiple and time scheduled *in situ* DNA delivery mediated by  $\beta$ -cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 103, 8618 (2006).
15. A. Dierich, E. Le Guen, N. Messadeq, J. F. Stoltz, P. Netter, P. Schaaf, J. C. Voegel, and N. Benkirane-Jessel, Bone formation induced by synergy-acting growth factors embedded in the multilayered film. *Adv. Mater.* 19, 693 (2007).
16. A. M. Yu, Y. J. Wang, E. Barlow, and F. Caruso, Mesoporous silica particles as templates for preparing enzyme-loaded biocompatible microcapsules. *Adv. Mat.* 17, 1737 (2005).
17. S. Facca, C. Cortez, C. Mendoza-Palomares, N. Messadeq, A. Dierich, A. P. R. Johnston, D. Mainard, J. C. Voegel, F. Caruso, and N. Benkirane-Jessel, Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 107, 3406 (2010).

Received: 16 September 2010. Accepted: 22 October 2010.

*J. Biomed. Nanotechnol.* 7, 1–4, 2011

(Submitted)

# Bone Regeneration with a Unique Nanostructured Living Implant

*Alice Ferrand,<sup>1,2,#</sup> , Sandy Eap<sup>1,3,#</sup>, Carlos Mendoza-Palomares,<sup>1,3,#</sup> Sybille Facca,<sup>1,#</sup> Florence Fioretti,<sup>1,3,4,#</sup> Deepak Kalaskar,<sup>4</sup> Sabine Kuchler-Bopp,<sup>1</sup> Sophie Demoustier-Champagne,<sup>4</sup> Didier Mainard,<sup>5</sup> Hassan Atmani,<sup>6</sup> Guy Schlatter,<sup>2</sup> Guy Ladam,<sup>6\*</sup> and Nadia Benkirane-Jessel<sup>1,5\*</sup>*

<sup>1</sup> INSERM Unité 977, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg Cedex

<sup>2</sup> LIPHT (UMR CNRS 7165) ECPM, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2

<sup>3</sup> Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg

<sup>4</sup> Bio-and Soft Matter (BSMA), Institute of Condensed Matter and Nanosciences (IMCN), Université catholique de Louvain (UCL), Croix du Sud 1, Box 4, B-1348 Louvain-la-Neuve

<sup>5</sup> Hôpital Central, Service de Chirurgie Orthopédique and CNRS UMR 7561, 29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, F-54035 Nancy Cedex

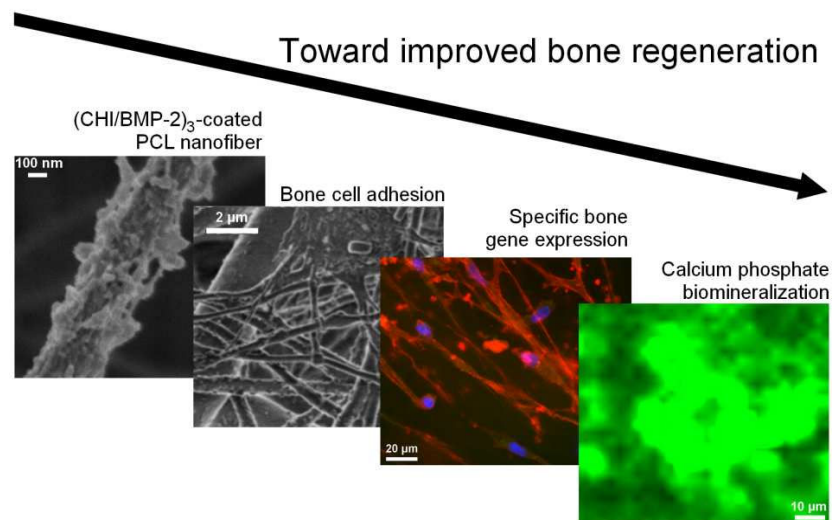
<sup>6</sup> La2B (SMS EA3233) Université de Rouen, Centre Universitaire d'Evreux, 1 rue du 7<sup>ème</sup> Chasseurs, F-27002 Evreux Cedex

\*Corresponding authors. Nadia Jessel, E-mail: [nadia.jessel@medecine.u-strasbg.fr](mailto:nadia.jessel@medecine.u-strasbg.fr), Phone: +33 390 243 376, Fax: +33 390 243 379. Guy Ladam, E-mail: [guy.ladam@univ-rouen.fr](mailto:guy.ladam@univ-rouen.fr), Phone: +33 232 399 087, Fax: +33 232 399 080.

# These authors have equally contributed to this work.

## ABSTRACT

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 bioactive nanofibrous bio-erodable poly( $\epsilon$ -caprolactone) polymer implants with highly promising bone regenerative properties. Nanotopography of the implants mimicks the fibrillar architecture of natural bone extra-cellular matrix, for better guidance of bone cells. Bioactivity of the implants is obtained through protective and stabilizing Layer-by-Layer nano-immobilization of a protein growth factor (BMP-2) in association with a polysaccharide (chitosan) atop nanofibers. All components of the implants are FDA-approved. The designed combination of nanotopographical and chemical surface properties, improves cell adhesion and ensures sustained cell-contact-dependent enzymatic release of the growth factor. In turn, proliferation, specific gene expression and calcium phosphate biomineralization by bone cells are strongly increased *in vitro*. The sophisticated strategy described here should considerably enhance implants therapeutic efficacy in terms of large bone defects repair, compared to current simplistic approaches. We believe that our results make a significant contribution to the area of regenerative nanomedicine.



## KEYWORDS

Bone tissue engineering; Drug delivery; BMP (bone morphogenetic protein); Electrospun polycaprolactone; Layer-by-Layer deposition

## MANUSCRIPT TEXT

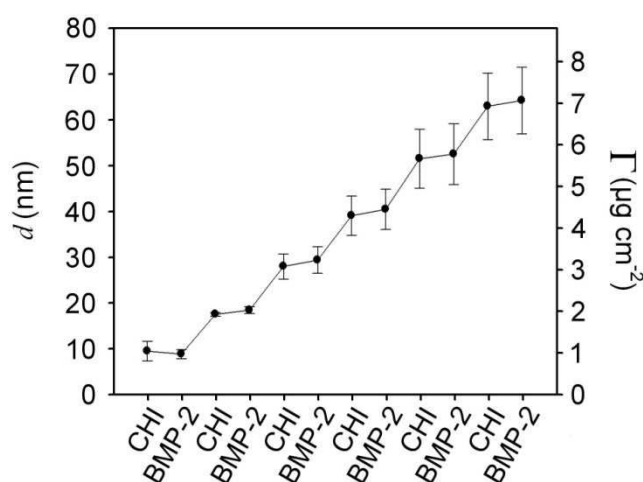
Smart nano-engineered materials allow novel therapeutic modalities such as improved specific cell targeting by means of nanoparticle-based drugs, resulting in decreased side effects for patients. Other advances are being made in sophisticated biomaterials for use in less invasive surgical implantations, 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 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 tissues and organs regeneration scaffolds. 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. The guidance provided by biomaterials may facilitate restoration of structure and function of damaged or dysfunctional tissues. Such materials should provide provisional 3-D support to interact with cells in ways that control their function, by guiding the spatially and temporally complex multicellular processes of tissue formation and regeneration.<sup>1-7</sup> A synthetic bone scaffold must be biocompatible, biodegradable to allow native tissue integration, and mimic the multidimensional hierarchical structure of native bone. In addition to being physically and chemically biomimetic, an ideal scaffold is capable of eluting bioactive molecules (e.g., BMPs, TGF- $\beta$ s, etc., to accelerate extracellular matrix production and tissue integration) or drugs (e.g., antibiotics, cisplatin, etc., to prevent undesired biological response such as sepsis or cancer recurrence) in a temporally and spatially controlled manner.<sup>8</sup>

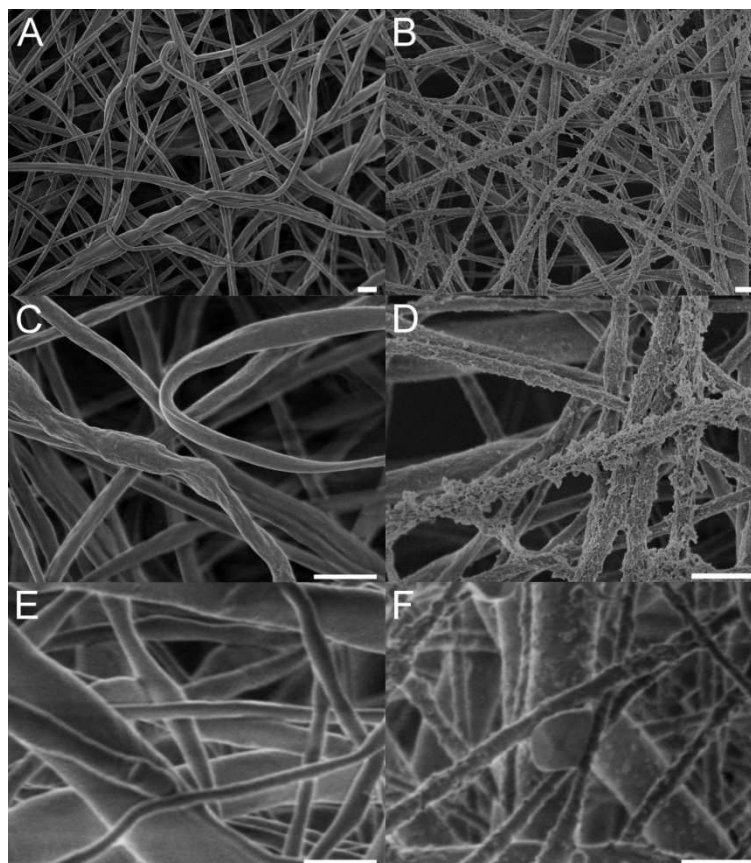
Several bio-mimicking medical devices for regenerative medicine have been inspired from the intricate fibrillar architecture of natural extra-cellular matrix (ECM) components. Such matrices have already shown remarkable success in tissue engineering applications,<sup>4,9</sup> examples of which include reconstruction of a dog urinary bladder,<sup>10</sup> or regeneration after brain injury in a mouse stroke model.<sup>11</sup> However, it is established that inert ECM mimetic scaffolds are not efficient to generate durable tissue repair. 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 and biomaterials incorporated with active compounds (drugs, genes or growth factors) within the form of coatings.<sup>12-26</sup>



The three current polymer processing technologies allowing the fabrication of nanofibrous scaffolds are self-assembly, phase separation, and electrospinning. By electrospinning, fibers down to the 10-nm scale in diameter, that is, in the range of fibers in the extracellular matrix can be prepared.<sup>13</sup> Our strategy for regenerating bone combined a synthetic electrospun nanofibrous membrane (ENM) comprised of the FDA-approved poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) polymer, and the bioactive growth factor BMP-2 confined atop the nanofibers according to the Layer-by-Layer (LbL) technology.<sup>15-21</sup> The latter consisted of simple alternate immersions of the scaffold into a solution of chitosan (CHI), a biocompatible polysaccharide with bone regenerative properties,<sup>27,28</sup> and a BMP-2 solution. The buildup of CHI/BMP-2 LbL architectures onto gold-coated substrates was shown by quartz crystal microbalance (QCM-D) to be effective up to 6 adsorption cycles (Figure 1). It followed a linear growth regime, with thickness and deposited mass increments of about 10 nm and  $1.1 \mu\text{g cm}^{-2}$ , respectively, upon each new deposited CHI/BMP-2 layer pair. The effective deposition of the bioactive LbL architectures atop ENM substrates was verified by means of scanning electron microscopy (SEM). The smooth morphology of native nanofibers left place to uniformly distributed nanostructured deposits around (CHI/BMP-2)<sub>3</sub>-treated nanofibers (Figure 2). Observed changes in the nanofibers roughness could also affect cell behavior along with the chemistry changes induced by the LbL treatment.

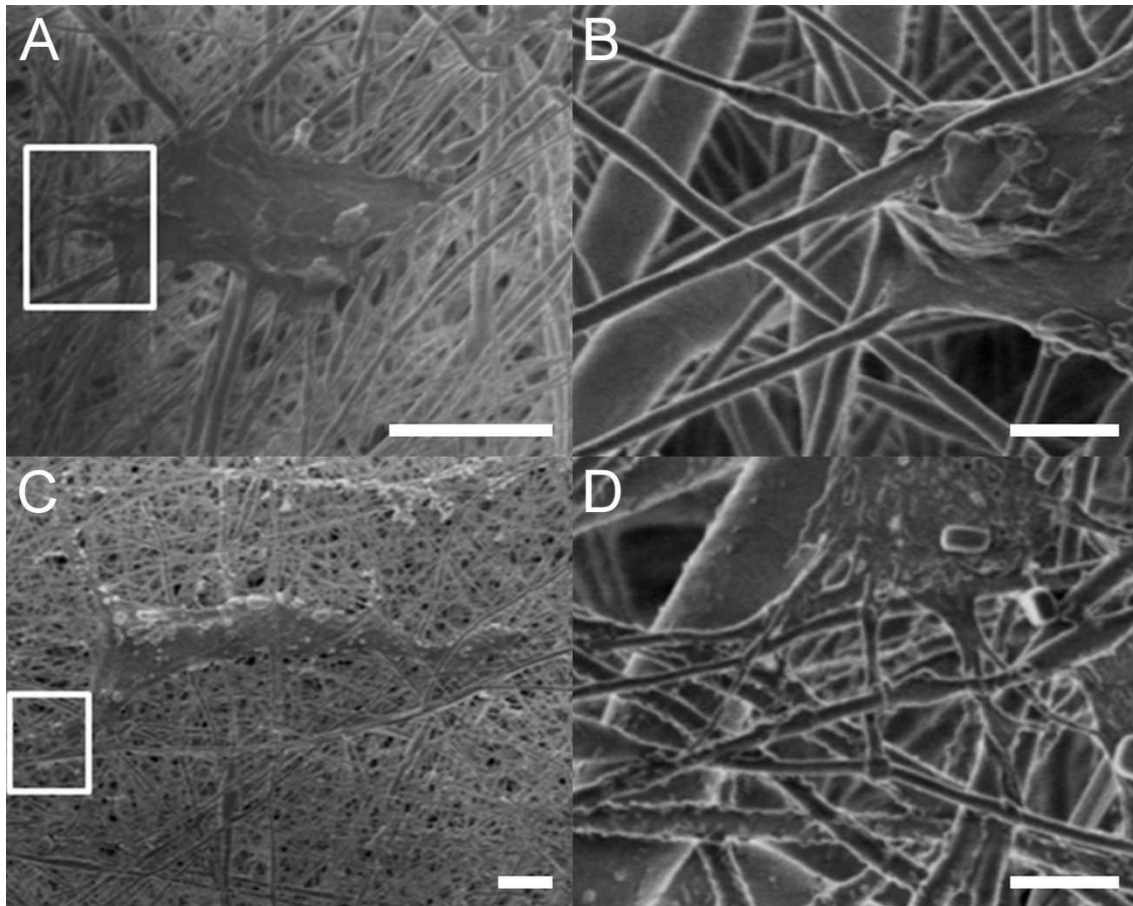


**Figure 1.** Mean thickness and mass evolutions during the buildup of (CHI/BMP-2)<sub>6</sub> LbL nanoarchitectures onto gold-coated quartz sensors followed by quartz crystal microbalance (QCM-D). Error bars represent the standard deviations over 3 distinct experiments.

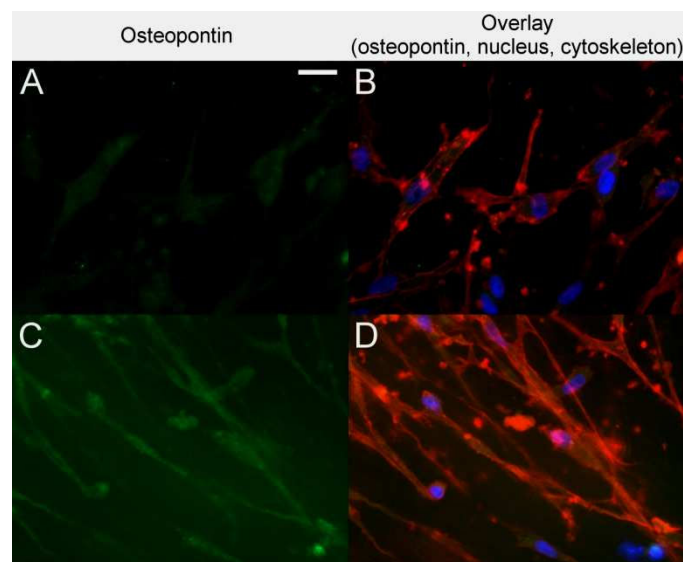


**Figure 2.** SEM visualization at different magnifications of the PCL electrospun nanofibers (A,C,E) before and (B,D,F) after the deposition of  $(\text{CHI/BMP-2})_3$  nanoarchitectures. Scale bars: 1  $\mu\text{m}$ .

Human osteoblasts (HOB cells) adhesion after 24-h culture was clearly promoted onto  $(\text{CHI/BMP-2})_3$ -treated ENM scaffolds compared to native scaffolds, resulting in larger, far more spread and elongated cells anchored to nanofibers through numerous filopodia extensions (Figure 3). In line with recently published data,<sup>29,30</sup> morphology changes between cells adhering onto native and LbL-treated ENM scaffolds are likely to be due to the combined modifications of both the surface chemistry and nanotopography upon the LbL treatment. The capacity of the modified ENM scaffolds to induce *in vitro* specific gene expression by HOB cells was verified by immunochemistry (Figure 4). Accordingly, the proliferation of HOB *in vitro* was much enhanced onto treated, compared to untreated, ENM scaffolds (data not shown).



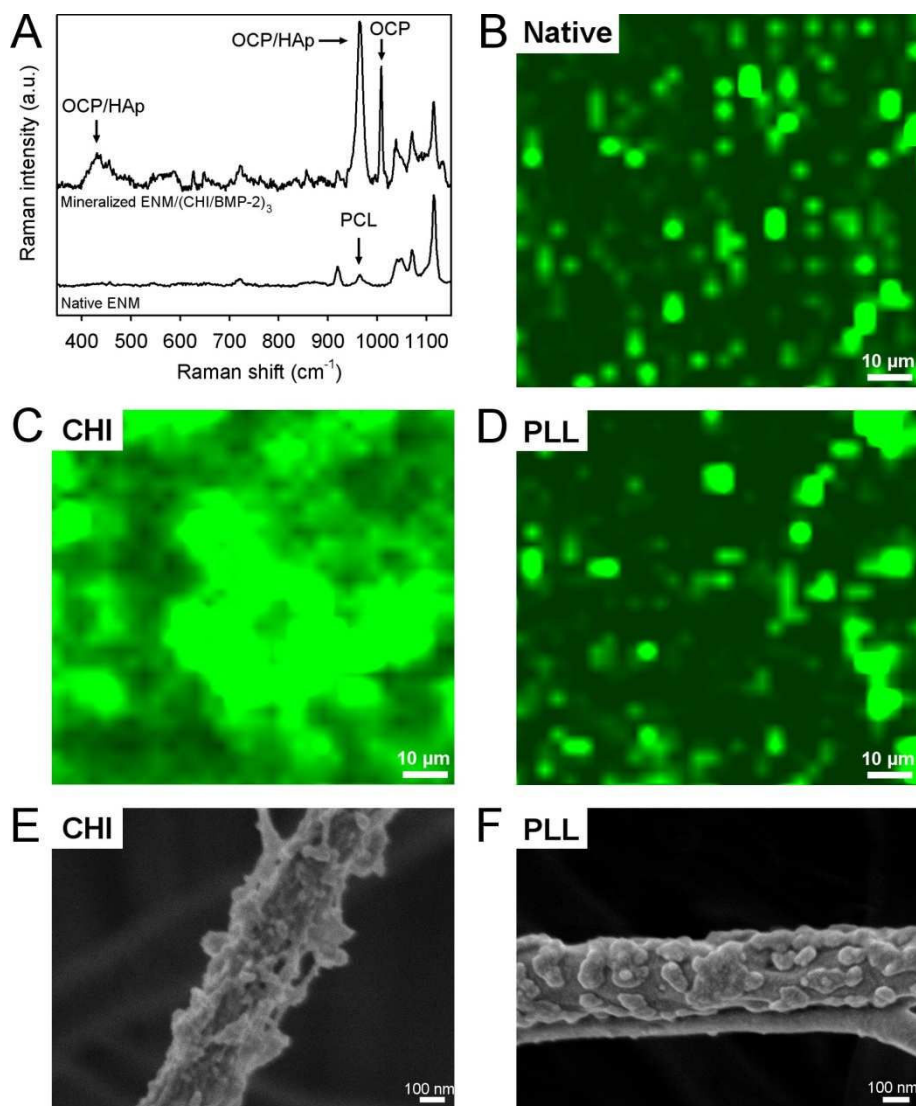
**Figure 3.** Typical morphology of HOB cells after 24 hours of culture onto (A) a native ENM scaffold and (C) a (CHI/BMP-2)<sub>3</sub>-treated ENM scaffold (scale bars: 10 μm). Images B and D correspond to the white-squared areas in images A and C, respectively (scale bars: 2 μm).



**Figure 4.** Osteopontin expression in HOB cells cultured for 7 days onto (A,B) native and (C,D) (CHI-BMP-2)<sub>3</sub>-treated ENM scaffolds. (A,C) Osteopontin expression. (B,D) Overlay of osteopontin (green), nucleus (blue) and cytoskeleton (red). Scale bar: 20 μm.

In order to inspect more deeply the capacity of these scaffolds to induce bone mineralization, a (CHI/BMP-2)<sub>3</sub>-treated ENM scaffold was analyzed by confocal Raman microspectroscopy after 21-day *in vitro* mineralization by HOB cells, to detect calcium phosphate (CaP) deposition. A scaffold treated using poly(L-lysine) (PLL) instead of CHI was also analyzed in order to test the versatility of the LbL method for embedding BMP-2 atop ENM fibers. A native non-mineralized scaffold was analyzed as a reference. Raman signatures were very similar for all scaffolds, except in the regions around 430 cm<sup>-1</sup> and 960 cm<sup>-1</sup> relative to CaP, where signatures of the mineralized scaffolds showed significant peaks proving the presence of CaP, contrary to the non-mineralized scaffold (Figure 5A). Raman signatures of the latter displayed a weak peak at 963 cm<sup>-1</sup> relative to PCL, whose contribution to the CaP peak on mineralized membranes was negligible.<sup>31</sup> The peaks at 430 cm<sup>-1</sup> and 960 cm<sup>-1</sup> revealed the presence of hydroxyapatite (HAp) and/or octacalcium phosphate (OCP), while the peak at 1005 cm<sup>-1</sup> was unambiguously attributable to OCP.<sup>32,33</sup> For pure OCP coating, a shoulder should be present at 966-970 cm<sup>-1</sup>.<sup>32,33</sup> 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 precursor phase of HAp in bone.<sup>33</sup>

2-D mappings of the Raman peak intensity of CaP over mineralized scaffolds revealed massive CaP deposition all over the (CHI/BMP-2)<sub>3</sub>-treated ENM scaffold, while much lower, similar amounts of CaP were deposited both in absence of LbL treatment, and when PLL was used instead of CHI (Figures 5B-D). These results support the promising promotive effect of CHI/BMP-2 LbL deposits on biomineralization. Moreover, the choice of the polycationic component of the deposits is of crucial importance. The remarkable potency of CHI-based treatments in terms of biomineralization might be due to better cell access to the surface-immobilized BMP-2, which must be facilitated by the open, plate-like morphology of (CHI/BMP-2)<sub>3</sub> deposits, while the compact morphology of (PLL/BMP-2)<sub>3</sub> deposits might limit cell access to the embedded growth factor (Figures 5E,F). Distinct morphologies can be explained by the low flexibility / high persistence length (6-12 nm)<sup>34</sup> of chitosan, limiting the interactions with BMP-2, while the high flexibility / low persistence length (2 nm)<sup>35</sup> of PLL allows optimized interactions with BMP-2.



**Figure 5.** (A) Typical Raman spectra obtained from (down) a non-mineralized native and (up) a mineralized (CHI/BMP-2)<sub>3</sub>-treated ENM scaffold (HAp: hydroxyapatite; OCP: octacalcium phosphate). Similar spectra were obtained for mineralized native and (PLL/BMP-2)<sub>3</sub>-treated scaffolds. Mineralization was performed by 21-day incubation of the scaffolds with human osteoblasts in adequate medium. Spectra are offset for sake of clarity. (B-D) 2-D mappings of the 960 cm<sup>-1</sup> Raman peak of calcium phosphate over the various mineralized scaffolds (90×90 μm<sup>2</sup>; meshsize 2.8 μm).

At this step, our results show that we can (i) design an ENM implant controlled in size and thickness, enriched in BMP-2 and, (ii) induce bone formation *in vitro*. The European and American authorities have already approved the use of BMP-2 for bone regeneration applications. For example, Medtronic offers InductOS® 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. 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 induction of new bone. The currently available systems are unsophisticated in this respect. In contrast, our proposed medical device, with cell-contact-dependent delivery from nanoreservoirs, is designed specifically for sustained availability of BMP-2. This strategy aims at a considerable enhancement of therapeutic efficacy compared to current simplistic approaches.

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 nano-immobilization and the protection of BMP-2. The nanostructured scaffold is produced using a special coating process that entraps growth factor into deposits atop the scaffold fibers. Recently, we have elucidated the mechanism by which cells come in contact and interact with such nanostructured coating.<sup>15,20,21,26</sup> Encapsulated by polymers, BMP-2 is 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, stimulates further proliferation of the cells. This strategy should allow fabricating a combination cell-therapy implant capable of robust and durable bone repair in large defects. We believe that our results make a significant contribution to the area of regenerative nanomedicine.

**Acknowledgments.** 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", C.M. thanks the Faculté de Chirurgie Dentaire 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). G.L. and H.A. thank the "Grand Évreux Agglomération" and the "Conseil Général de l'Eure" for partial financial support of La2B. The authors thank Prof. Mickael F. Rubner from the Department of Materials Science and Engineering, Massachusetts Institute of Technology, for helpful scientific discussions.

**Supporting Information Available.** Experimental Procedures: Materials; Quartz Cristal Microbalance with Dissipation monitoring (QCM-D); Electrospinning; SEM observation; Buildup of the Layer-by-Layer (LbL) films onto ENM scaffolds; Cells culture; Confocal Raman microspectroscopy; Cell viability and proliferation; Immunofluorescence; Confocal laser scanning microscopy (CLSM). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References

1. Peppas, N. A.; Langer, R. New challenges in biomaterials. *Science* **1994**, *263*, 1715-1720.
2. Hubbell, J. A. Biomaterials in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **1995**, *13*, 565-576.
3. Langer, R.; Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature* **2004**, *428*, 487-492.
4. Griffith, L. G.; Naughton, G. Tissue engineering: Current challenges and expanding opportunities. *Science* **2002**, *295*, 1009-1014.
5. Chaikof, E. L.; Matthew, H.; Kohn, J.; Mikos, A. G.; Prestwich, G. D.; Yip, C. M. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *961*, 96-105.
6. Yang, C.; Hillas, P. J.; Báez, J. A.; Nokelainen, M.; Balan, J.; Tang, J.; Spiro, R.; Polarek, J. W. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* **2004**, *18*, 103-119.
7. Kumar, G.; Tison, C. K.; Chatterjee, K.; Pine, P. S.; McDaniel, J. H.; Salit, M. L.; Young, M. F.; Simon, C. G. Jr. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9188-9196.
8. Porter, R.; Ruckh, T. T.; Popat, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 1539-1560.
9. Dvir, T.; Tinko, B. P.; Kohane, D. S.; Langer, R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 13-22.
10. Oberpenning, F.; Meng, J.; Yoo, J. J.; Atala, A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 149-155.
11. Park, K. I.; Teng, Y. D.; Snyder, E. Y. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1111-1117.
12. Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.
13. Kenawy, E.; Layman, J. M.; Watkins, J. R.; Bowlin, G. L.; Matthews, J. A.; Simpson, D. G.; Wnek, G. E. Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials* **2003**, *24*, 907-913.
14. Zhang, S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1171-1178.
15. Jessel, N.; Atalar, F.; Lavalle, P.; Mutterer, J.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Ogier, J. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 692-695.
16. Benkirane-Jessel, N.; Lavalle, P.; Meyer, F.; Audouin, F.; Frisch, B.; Schaaf, P.; Ogier, J.; Decher, G.; Voegel, J. C. Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1507-1514.



17. Benkirane-Jessel, N.; Schwinté, P.; Falvey, P.; Darcy, R.; Haïkel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Ogier, J. Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 174-182.
18. Benkirane-Jessel, N.; Lavalle, P.; Hübsch, E.; Holl, V.; Senger, B.; Haïkel, Y.; Voegel, J. C.; Ogier, J.; Schaaf, P. Short-time tuning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 648-654.
19. Lynn, D. M. Layers of opportunity: Nanostructured polymer assemblies for the delivery of macromolecular therapeutics. *Soft Matter* **2006**, *2*, 269-273.
20. Jessel, N.; Oulad-Abdelghani, M.; Meyer, F.; Lavalle, P.; Haïkel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C. Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by  $\beta$ -cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8618-8621.
21. Dierich, M.; Le Guen, E.; Messadeq, N.; Netter, P.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Jessel, N. Bone formation mediated by growth factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 693-697.
22. Barnes, C. P.; Sell, S. A.; Boland, E. D.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 1413-1433.
23. Kim, B. S.; Park, S. W.; Hammond, P. T. Hydrogen-bonding layer-by-layer-assembled biodegradable polymeric micelles as drug delivery vehicles from surfaces. *ACS Nano* **2008**, *2*, 386-392.
24. Krogman, K. C.; Lowery, J. L.; Zacharia, N. S.; Rutledge, G. C.; Hammond, P. T. Spraying asymmetry into functional membranes layer-by-layer. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 512-518.
25. Yoo, H. S.; Kim, T. G.; Park, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1033-1042.
26. Facca, S.; Cortez, C.; Mendoza-Palomares, C.; Messadeq, N.; Dierich, A.; Johnston, A. P. R.; Mainard, D.; Voegel, J. C.; Caruso, F.; Benkirane-Jessel, N. Active multilayered capsules for in vivo bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3406-3411.
27. Di Martino, A.; Sittinger, M.; Risbud, M. V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5983-5990.
28. Kim, I. Y.; Seo, S. J.; Moon, H. S.; Yoo, M. K.; Park, I. Y.; Kim, B. C.; Cho, C. S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 1-
29. Anselme, K.; Davidson, P.; Popa, A. M.; Giazzon, M.; Liley, M.; Ploux, L. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometer scale. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3824-3846.
30. Wheeldon, I.; Farhadi, A.; Bick, A. G.; Jabbari, E.; Khademhosseini, A. Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell-materials interactions. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 212001.
31. Taddei, P.; Tinti, A.; Reggiani, M.; Fagnano, C. In vitro mineralization of bioresorbable poly( $\epsilon$ -caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: A vibrational and thermal investigation. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744-747*, 135-143.
32. Fowler, B. O.; Markovic, M.; Brown, E. W. Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra. *Chem. Mater.* **1993**, *5*, 1417-1423.
33. Crane, N. J.; Popescu, V.; Morris, M. D.; Steenhuis, P.; Ignelzi, M. A. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone* **2006**, *39*, 434-442.
34. Cölfen, H.; Berth, G.; Dautzenberg, H. Hydrodynamic studies on chitosans in aqueous solution. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 373-383.
35. Brant, D. A.; Flory, P. J. The configuration of random polypeptide chains. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2788-2800.