



**HAL**  
open science

# Fabrication par impression 3D d'un matériau composite associant un phosphate de calcium et des cellules humaines pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse.

Robin Siadous

## ► To cite this version:

Robin Siadous. Fabrication par impression 3D d'un matériau composite associant un phosphate de calcium et des cellules humaines pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse.. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03549295

**HAL Id: hal-03549295**

**<https://ephe.hal.science/hal-03549295>**

Submitted on 31 Jan 2022

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



École Pratique  
des Hautes Études



**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**  
**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MEMOIRE**

**présenté**  
**par**  
**SIADOUS Robin**

**Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études**

**TITRE :** « Fabrication par impression 3D d'un matériau composite associant un phosphate de calcium et des cellules humaines pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse. »

**soutenu le : Mercredi 07 Juillet 2021**

**devant le jury suivant :**

*Dr. Frachet Véronique – Présidente*

*Pr. Catros Sylvain – Tuteur scientifique*

*Dr. Belamie Emmanuel – Tuteur pédagogique*

*Pr. Weiss Pierre – Rapporteur*

*Dr. Guignandon Alain – Examineur*

**Mémoire préparé sous la direction de :**

*Pr Catros Sylvain*

**Intitulé de la structure d'accueil : Unité INSERM U1026 « Biotis », Bordeaux**

**Directeur : Pr Fricain Jean-Christophe**

**et de**

*Dr Belamie Emmanuel*

**Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Institut Charles Gerhardt Montpellier, UMR5253**

**EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)**

**Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : CEDI (Les Cellules et leur Environnement : Dynamique des Intéractions)**

---

# REMERCIEMENTS

---

Ces trois dernières années dédiées en partie à mon travail sur ce mémoire d'EPHE ont été pour moi un véritable raz-de-marais émotionnel. Tantôt remplies de doutes et de déceptions mais souvent faites d'excitation et de découvertes qui font le piment de ce métier. C'est à vous tous que je dédie ces quelques remerciements.

En premier lieu, je tiens à remercier mes encadrants pour ce travail :

**Sylvain Catros**, mon tuteur scientifique, l'optimisme et la zénitude incarné, qui m'a laissé une autonomie quasi complète sur ce projet tout en gardant un regard scientifique averti sur les avancés des travaux. Avec mon caractère, tu étais bien une des rares personnes qui pouvait m'encadrer pour ce projet !

**Emmanuel Belamie**, mon tuteur pédagogique, qui a su être là pour m'accompagner dans l'ensemble des démarches de l'EPHE, la rédaction du mémoire et qui a su me rassurer dans les dernières lignes droites du projet quand j'étais en panique.

Je tiens également à remercier conjointement **Jean-Christophe Fricain**, directeur de l'unité INSERM U1026 dont je fais partie, et la **délégation régionale de l'INSERM** Bordeaux qui m'ont permis de réaliser ces 3 années d'EPHE. Grâce à eux, j'ai pu avoir une formation de qualité totalement financée et des conditions de travail optimum pour un projet personnel.

Je remercie également les « travailleurs de l'ombre », ceux qui sont parfois oubliés mais sans qui le travail serait bien plus pénible au quotidien. « **Betty** » **Auger** à la laverie, **Patrick Guittou** dont l'activité est inclassable tellement il est omniprésent et **Evelyne Castet** la grande prêtresse de la gestion !

Je tiens aussi à remercier ici Madame **Nathalie Person**, Directrice de la formation continue de l'EPHE, que je ne connais pas personnellement mais qui a toujours été d'une grande aide et d'une rapidité redoutable pour répondre à mes demandes concernant l'administratif de l'EPHE.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé aux expérimentations de ce projet et plus particulièrement **Jérôme Kalisky**, **Bruno Paiva Dos Santos** et **Jérôme Lignerou** qui m'ont beaucoup aidé pour les caractérisations physico-chimiques des matériaux. Sans vous les gars, ce mémoire ferait 10 pages !

J'adresse bien évidemment toute ma gratitude à **Reine Bareille** qui a contribué à la correction du mémoire. Tu m'as donné ma chance il y a 13 ans quand j'ai débuté ma carrière et as toujours été près de moi durant ces années pour me soutenir, me conseiller et me pousser à avancer dans ma carrière. Ce diplôme je ne l'aurais sûrement jamais fait sans toi. Tout simplement : Merci !

Je remercie aussi **l'ensemble de l'unité U1026 et de l'ART**, ses chercheurs, ses ITA et ses étudiants pour l'ensemble des échanges scientifiques et des conseils apportés durant ces 3 ans. Seul on avance vite mais à plusieurs on avance plus loin ! Merci à vous tous.

Pour finir, mes derniers remerciements vont aller à ma famille et mes amis.  
Tous d'abord à **mes parents**, qui ont toujours été présents au cours de ma vie et qui ont toujours tout donné pour que je puisse réussir. Ce travail je l'ai débuté pour moi mais je l'ai fini surtout pour vous !  
Puis à ma compagne **Laurie**, dont le soutien moral tout au long de ces années a été essentiel pour mener de front tous nos projets personnels et mon projet professionnel. Maintenant nous allons pouvoir nous consacrer pleinement au plus important de tous !

A tous mes amis de Provence, de Saint-Martin, de Bordeaux et à mon seul ami chinois pour leurs encouragements durant ces 3 ans .... Et merci à Papi Fougasse !

---

# SOMMAIRE

---

REMERCIEMENTS .....	2
SOMMAIRE .....	4
LISTE DES ABREVIATIONS .....	7
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTES DES TABLEAUX.....	9
LISTES DES ANNEXES .....	9
I-INTRODUCTION .....	10
1. Le tissu osseux .....	10
2. Concept de l'ingénierie tissulaire .....	13
2.1. Les cellules utilisées en bio-ingénierie du tissu osseux.....	14
2.2. Les facteurs de croissance en bio-ingénierie du tissu osseux .....	15
2.3. Les matériaux en bio-ingénierie du tissu osseux.....	17
2.3.1. Les matériaux naturels .....	18
2.3.2. Les matériaux synthétiques.....	19
3. Les approches conceptuelles en Ingénierie Tissulaire .....	24
3.1. L'approche « top-down » .....	25
3.2. L'approche « bottom-up ».....	25
4. La Bio-Impression .....	26
4.1. Les différentes techniques de bio-impression .....	27
4.1.1. Impression par technologie à jet d'encre.....	28
4.1.2. Impression par Micro-extrusion .....	28
4.1.3. Impression assistée par laser (LAB).....	29
4.1.4. La Stéréolithographie (SLA) .....	30
4.2. La bio-impression dans le domaine de l'ingénierie osseuse .....	31
4.2.1. Impression 3D ou bio-impression ?.....	31
4.2.2. L'évolution de la bio-impression en ingénierie osseuse .....	33
4.3. L'INNOTERE CPC-Paste matériau de référence : intérêt et limites .....	37
5. Objectifs scientifiques de l'étude .....	37
5.1. Objectif 1 : Développement et caractérisation du matériau phosphocalcique imprimable..	39
5.2. Objectif 2 : Caractériser l'imprimabilité du matériau.....	40
5.3. Objectif 3 : Evaluation biologique de la co-impression .....	41
II-Matériels et Méthodes.....	42
6. Techniques de caractérisation physico-chimiques.....	42

6.1. Détermination du taux de méthacrylation de la gélatine : TNBS Assay.....	42
6.2. Fabrication du matériau composite imprimable : GelMA10%/A.Hya1,25%/HA4%.....	43
6.3. Evaluation des propriétés viscoélastiques du matériau par rhéologie. ....	44
6.4. Test de gonflement du matériau : Swelling test .....	44
6.5. Test de dégradation hydrolytique .....	45
6.6. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB) .....	46
6.7. Détermination de la quantité de phase minérale par analyse thermogravimétrique (ATG) .	46
6.8. Caractérisation de la phase minérale par diffraction des rayons X (DRX).....	47
7. Caractérisation de l'imprimabilité du matériau phosphocalcique.....	47
7.1. Impression de lignes :.....	48
7.2. Impression de grilles :.....	48
8. Caractérisation biologique des matériaux.....	50
8.1. Préparation de l'encre Alg/AHya-MG63.....	50
8.2. Paramètres et modèle de co-impression .....	51
8.3. Test de cytotoxicité indirect .....	52
8.4. Test de viabilité Live/Dead (L/D) .....	53
8.5. Test de prolifération : Alamar blue assay.....	54
8.6. Tests de différenciation ostéoblastique : coloration de la phosphatase alcaline et coloration au rouge alizarin des dépôts minéralisés. ....	54
III-RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	56
9. Caractérisation du matériau.....	56
9.1. Détermination du degré de méthacrylation de la gélatine : TNBS Assay .....	56
9.2. Fabrication du matériau composite imprimable : GelMA10%/A.Hya1,25%/HA4%.....	56
9.3. Rhéologie :.....	57
9.4. Swelling Test :.....	57
9.5. Microscopie Electronique à Balayage :.....	58
9.6. Dégradation hydrolytique : .....	59
9.7. Analyse Thermo Gravimétrique .....	59
9.8. Diffraction des Rayons X.....	60
10. Caractérisation de l'impression.....	61
10.1. Impression de lignes :.....	61
10.2. Impression de grilles.....	62
11. Evaluation biologique .....	63
11.1. Evaluation cellulaire sans impression.....	63
11.1.1. Test de cytotoxicité : MTT / RN .....	63
11.1.2. Test de Viabilité : Live /Dead .....	64

11.2. Caractérisation biologique post impression.....	65
11.2.1. test de viabilité Live dead.....	65
11.2.2. Test de prolifération : Alamar blue assay.....	66
11.2.3. Tests de différenciation ostéoblastique : coloration de la phosphatase alcaline et coloration au rouge alizarin des dépôts minéralisés.....	67
IV-DISCUSSION.....	69
V-CONCLUSION.....	75
VI-PERSPECTIVES .....	77
BIBLIOGRAPHIE.....	79
ANNEXES.....	87

---

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>ADSCs</b> : Adipose Derived Stem Cells	<b>M-CSF</b> : Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>Ag</b> : Argent	<b>MEB</b> : Microscopie électronique à balayage
<b>AHya</b> : Acide Hyaluronique	<b>MSCs</b> : Mésoenchymal Stem Cells
<b>Alg</b> : Alginate	<b>RN</b> : Rouge Neutre
<b>ALP</b> : Alcaline Phosphatase	<b>OCN</b> : OstéoCalcine
<b>ART</b> : Accélérateur de Recherche Technologique	<b>OPG</b> : OstéoProtégérine
<b>ATG</b> : Analyse ThermoGravimétrique	<b>OSX</b> : Ostérix
<b>BMP</b> : Bone Morphogenetic Protein	<b>PBMCs</b> : Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>CAO</b> : Conception Assistée par Ordinateur	<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline
<b>CaP</b> : Phosphate de Calcium	<b>PCL</b> : PolyCaproLactone
<b>COLL1A1</b> : Collagène de type I	<b>PDMS</b> : PolyDiMethylSiloxane
<b>CPC</b> : Ciment Phospho-Calcique	<b>PEGDA</b> : PolyEthylène Glycol DiAcrylate
<b>CTR</b> : Calcitonin Receptor	<b>PFA</b> : ParaFormAldehyde
<b>DMLS</b> : Direct Metal Laser Sintering	<b>PGA</b> : Acide PolyGlycolique
<b>DMP1</b> : Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1	<b>PLGA</b> : Poly Lactic-co-Glycolic Acid
<b>DMSO</b> : DiMethyl SulfOxide	<b>PMMA</b> : Poly(Méthyle MéthAcrylate)
<b>DPSCs</b> : Dental Pulp Stem Cells	<b>RANKL</b> : Receptor Activator of Nuclear factor- $\kappa$ B Ligand
<b>DRX</b> : Diffraction des Rayons X	<b>RTqPCR</b> : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>EDTA</b> : EthylèneDiamineTetraAcétique	<b>RunX2</b> : Runt-related transcription Factor 2
<b>EthD-1</b> : Ethidium homodimère	<b>SCAPs</b> : Stem Cells from the Apical Papilla
<b>FC</b> : Facteur de Croissance	<b>SDS</b> : Sodium DodécylSulfate
<b>FDA</b> : Food and Drug Administration	<b>SLA</b> : Stéréolithographie
<b>FDM</b> : Fused Deposition Modelling	<b>SOST</b> : Sclérostine
<b>GeIMA</b> : Gélatine Méthacrylée	<b>Sr</b> : Strontium
<b>HA</b> : Hydroxyapatite	<b>SVF</b> : Sérum de Veaux Fœtal
<b>hBMSCs</b> : human Bone Marrow Stem Cells	<b>TCP</b> : Tri Calcium Phosphate
<b>HBSS</b> : Hanks' Balanced Salt Solution	<b>TGF</b> : Transforming Growth Factor
<b>HCl</b> : Hydrogen Chloride	<b>TNBS</b> : TriNitrobenzene Sulfonic Acid
<b>hPDLS</b> : human Peridontal Ligament Stem Cells	<b>TNF</b> : Tumor Necrosis Factor
<b>ICP-MS</b> : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	<b>TRAP</b> : Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
<b>IGF</b> : Insulin-like Growth Factor	<b>VEGF</b> : Vascular Endothelial Growth Factor
<b>IMDM</b> : Iscove Modified Dulbecco Media	
<b>LAB</b> : Laser Assisted Bioprinter	
<b>LAP</b> : Lithium Phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinate	

---

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1: Organisation structurale du tissu osseux : .....	11
Figure 2: Les étapes de réparation d'une fracture osseuse .....	11
Figure 3: Les trois principaux types cellulaires présents dans le tissu osseux .....	13
Figure 4: Concept de l'ingénierie tissulaire.....	14
Figure 5 : Schéma de la communication cellulaire via les facteurs de croissances.....	16
Figure 6: Schéma des différentes stratégies d'incorporation des facteurs de croissance dans un biomatériau.....	17
Figure 7 : Exemples de biomatériaux naturels.....	19
Figure 8: Classification des biomatériaux par El-Meliegy et von Noort, 2011 .....	20
Figure 9 : Exemple de matériaux phosphocalciques.....	21
Figure 10: Représentation schématique de la Formation osseuse à partir d'un bio verre 45S5.....	22
Figure 11: Structure chimiques des principaux polymères synthétiques utilisés en ingénierie osseuse.....	23
Figure 12: Approche conceptuelles en ingénierie tissulaire.....	24
Figure 13: Représentation graphique du nombre de publications scientifiques parues sur PubMed contenant les mots clé « Bioprinting » ou « 3D printing » depuis 2006 .....	26
Figure 14: Représentation schématique des 4 principales technologies utilisées en bioimpression...	27
Figure 15: Représentation schématique des deux systèmes de technologie d'impression à jet d'encre.....	28
Figure 16 Représentation schématique des trois systèmes de technologie d'impression par micro-extrusion.....	29
Figure 17: Représentation schématique de l'impression assistée par laser .....	30
Figure 18: Représentation schématique de l'impression par stéréolithographie .....	31
Figure 19: Crâne en plastique obtenue par impression 3D et implanté en 2012 .....	32
Figure 20: Graphique représentatif de la recherche bibliographique sur Pubmed montrant le nombre de publication pour différents tissus en fonction du mot clé associé.....	32
Figure 21: Impression d'encre de BMP2 par technologie inkjet.....	33
Figure 22: Imprimante 3D Discovery de RegenHU équipée de 4 têtes d'impression .....	35
Figure 23: Illustration de la méthode d'impression coaxiale par Raja Naren et Yun Hui-Suka.....	36
Figure 24: Schéma de la méthode employée par Ahlfeld et al pour co-imprimer la pâte CPC et l'encre cellulaire Alginate/hTERT-MSCs.....	36
Figure 25: Schéma explicatif du principe de synthèse de l'hydroxyapatite dans la gélatine méthacrylée employée par Zuo et al.....	39
Figure 26: Schéma de la réaction entre une amine primaire libre et le TNBS pour former un dérivé coloré mesurable par spectrophotométrie. S.....	42
Figure 27: Schéma du principe de fonctionnement d'un rhéomètre à plateaux parallèles.....	44
Figure 28: Schéma du principe de fonctionnement d'un ATG.....	46
Figure 29: Schéma explicatif du résultat d'impression en fonction de la variation du ratio pression/vitesse de déplacement de la tête d'impression.....	48
Figure 30: Schéma explicatif de l'évaluation de la résolution d'impression.....	49
Figure 31: Schéma explicatif de l'imprimabilité d'un hydrogel.....	49
Figure 32: Visualisation à la loupe du matériau GelMA10%/HA4%/Ahya1,25% après polymérisation aux UVs.....	56
Figure 33: Résultats du test de rhéologie.....	57
Figure 34: Résultats du test de Swelling test .....	57

Figure 35: Imagerie des matériaux par Microscopie électronique à balayage. ....	58
Figure 36: Résultats du test de suivi de la dégradation hydrolytique du GelMA10% + A.Hya1,25 % + HA4%. ....	59
Figure 37: Résultats de l'analyse thermo gravimétrique .....	59
Figure 38 : Caractérisation de la GelMA10% + A.Hya1,25 % + HA4% par DRX. ....	60
Figure 39 : Mesure du diamètre des lignes post-impression. ....	61
Figure 40: Impression d'une grille et traitement des données.....	62
Figure 41: Résultats du test de cytotoxicité MTT/RN de la GelMA10% + A.Hya1,25 % + HA4% versus GelMA10% + A.Hya1,25 %. N=6 échantillons.....	63
Figure 42: Imagerie à fluorescence du test L/D sans impression.....	64
Figure 43: Test de viabilité cellulaire live/dead à sur des cellules MG63 post-impression.....	65
Figure 44: Test de prolifération cellulaire Alamar blue sur les MG63 co-imprimées avec le scaffold phosphocalcique .....	66
Figure 45: Mise en évidence de l'activité de la phosphatase alcaline des MG63 co-imprimés avec le scaffold phosphocalcique.....	67
Figure 46: Coloration des dépôts minéralisés au rouge alizarin. ....	67
Figure 47: Schématisation de l'effet du gonflement du matériau sur la taille des pores avant et post-impression. ....	71
Figure 48: Photographie de la tête d'extrusion équipé d'une source UV et la schématisation de son principe de fonctionnement.....	73
Figure 49: Comparatif des profils d'expression des gènes ostéoblastiques exprimés par des lignées cellulaires issues d'ostéosarcomes.....	74

---

## LISTES DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Exemples de cellules primaires et de lignées cellulaires utilisées en ingénierie osseuse et leurs origines tissulaires ou cellulaires.....	15
Tableau 2: Comparatif des valeurs de forces de compression nécessaire à la destruction d'un tissu ou d'un matériau. ....	34
Tableau 3: Composition du ciment CPC Innotere d'après Lode et al 2014.....	37

---

## LISTES DES ANNEXES

---

**ANNEXE 1** : Protocole de synthèse de la gélatine méthacrylée

**ANNEXE 2** : Protocole de synthèse des particules d'hydroxyapatite

**ANNEXE 3** : Schémas du modèle de co-impression et de d'impression de la bio-encre.

**ANNEXE 4** : Résultat du calcul de la régularité d'impression pour la grille N°2.

---

# I-INTRODUCTION

---

## 1. Le tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif fortement minéralisé qui joue plusieurs rôles dans l'anatomie et la physiologie des organismes vertébrés. Les premiers organismes pourvus d'un squelette ossifié sont apparus lors de la période Cambrienne il y a environ 500 millions d'années (Boitere, 2017)<sup>#</sup>. Le tissu osseux possède des fonctions mécaniques dans la locomotion et participe à la protection des organes internes avec les muscles. Il joue un rôle dans le contrôle et le maintien de l'homéostasie du calcium par le stockage et la libération des minéraux lors du remodelage, mais c'est aussi un réservoir cellulaire important (cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse) (Florencio-Silva et al., 2015).

On peut considérer l'os comme un matériau composite constitué d'une double structure (Figure 1) :

- **L'os cortical** présentant une structure dense avec une porosité de 3 à 12% : il est composé de lamelles cylindriques organisées en cercles concentriques autour de canaux centraux abritant les nerfs et les vaisseaux sanguins permettant le transport à double sens des signaux mécaniques chimiques et cellulaires depuis l'extérieur de l'os vers les compartiments les plus internes (os spongieux ou trabéculaire). Ces structures, appelées ostéons sont constitués principalement de fibres de collagène avec une organisation particulière qui confèrent à l'os cortical une forte résistance aux contraintes mécaniques. L'os cortical assure l'essentiel des propriétés protectrices de la structure osseuse. (Cooper et al., 2004)
- **L'os trabéculaire ou os spongieux**, qui représente 20% du squelette, avec une porosité comprise entre 50 et 90% et se présente sous la forme d'un réseau de travées osseuses. Les nombreuses travées sont traversées par des structures vasculaires qui abritent la moelle osseuse. De par sa forme et son organisation, ce réseau confère la majeure partie des propriétés mécaniques de l'os. Il abrite aussi une activité cellulaire importante liée à la présence des cellules de la niche vasculaire et hématopoïétique.

---

<sup>#</sup> Tout au long de ce mémoire, les notes destinées à expliciter les propos seront présentées en bas de page et identifiées par le symbole (exemple<sup>#</sup>). Les références bibliographiques sont placées en fin d'ouvrage et par ordre alphabétique et identifiées à l'aide de parenthèses : exemple (Auteur et al., année)

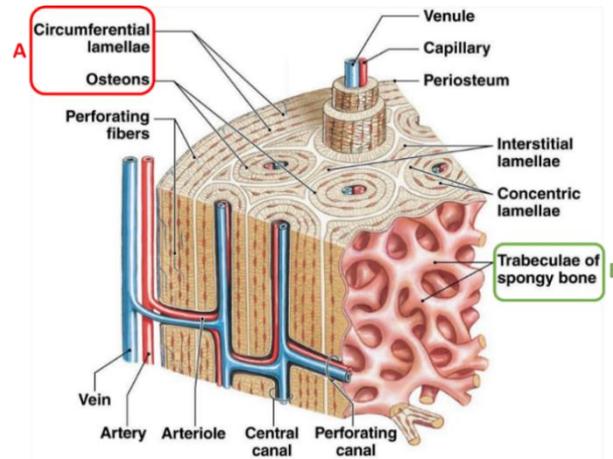


Figure 1: Organisation structurale du tissu osseux : A) os cortical composé de l'os lamellaire et des ostéons. B) Os trabéculaire qui contient la moelle osseuse. Source : <https://slideplayer.com/slide/15429404/>

Malgré son apparente inertie, le tissu osseux subit tout au long de sa vie un remodelage caractérisé par l'alternance de phénomènes de résorption et de néoformation, lui permettant de réparer les lésions traumatiques ou bien d'éliminer les tissus vieillissants au profit d'un os néoformé. Ce processus repose sur un équilibre entre activité ostéoblastique et ostéoclastique. Ainsi la résorption de l'os peut intervenir pour mettre à disposition des ions minéraux tels que le calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , des ions phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$  ou bien pour éliminer des structures calleuses formées lors de la réparation d'une fracture. A *contrario*, la formation osseuse a pour but de réparer les structures endommagées. (Figure 2)

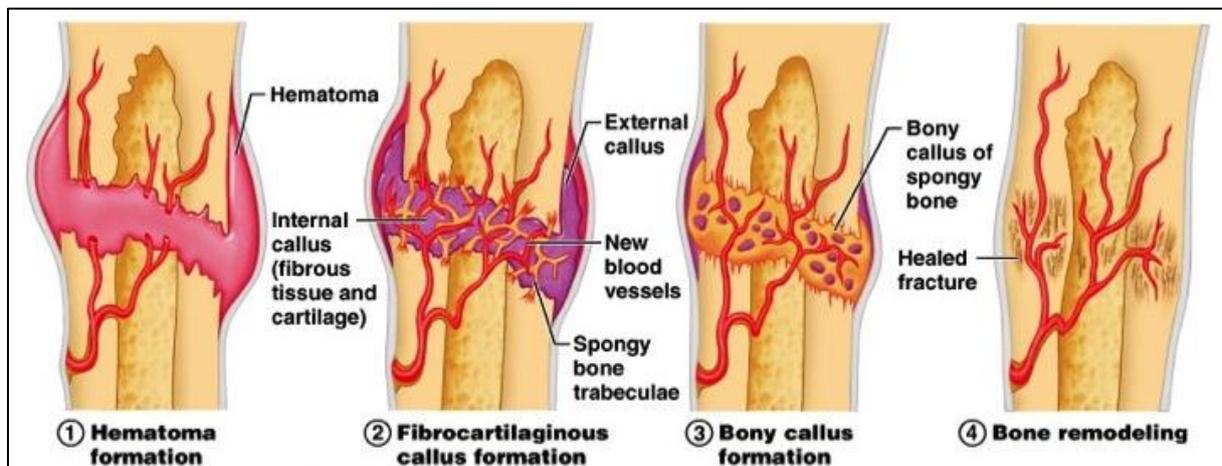


Figure 2: Les étapes de réparation d'une fracture osseuse : 1) Formation d'un hématome sanguin au niveau du site de la fracture. 2) Formation d'un cal fibro-cartilagineux avec une néo-angiogenèse, et le début de la formation osseuse. 3) Formation d'un cal osseux avec un début d'os immature en voie de minéralisation. 4) Remodelage osseux : Cicatrisation complète accompagnée à la fois d'une élimination du cal osseux et une minéralisation de la matrice extra cellulaire (Latimer, 2018).

Cette balance formation/résorption est coordonnée par des signaux mécaniques, des facteurs biochimiques et surtout par la présence de plusieurs types cellulaires jouant chacun un rôle spécifique durant le cycle de vie de l'os.

Ces cellules sont :

Les Ostéoclastes : Ce sont des cellules poly-nucléées issues de précurseurs hématopoïétiques qui sont responsables de la résorption osseuse. La présence dans l'os trabéculaire de certaines cytokines comme M-CSF et RANKL va déclencher la fusion des précurseurs cellulaires mononucléés en une cellule mature multi-nucléée polarisée. Cette cellule différenciée exprime plusieurs gènes codant pour des enzymes qui vont dégrader la matrice extracellulaire comme la cathepsine k (CATK) ou la tartrate-résistant acid phosphatase (TRAP) (Boyle et al., 2003). (Figure 3A)

Les Ostéoblastes : Ce sont les cellules responsables de la néoformation osseuse. Elles sont issues de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) et sont responsables de la sécrétion et de la minéralisation de la matrice osseuse. Ils ont un rôle essentiel dans le processus de néoformation osseuse. En présence d'éléments inducteurs utilisés en culture cellulaire, comme la bone morphogenetic protein 2 (BMP2), l'acide ascorbique, le beta-glycérophosphate ou la dexaméthasone, les MSCs vont se différencier en pré-ostéoblastes (Burns et al., 2010; Grellier et al., 2009). Cette différenciation se traduit par l'expression spécifique d'un facteur de transcription : Runt-related transcription factor 2 (RunX2) qui va réguler la surexpression des gènes permettant au pré-ostéoblaste de devenir un ostéoblaste fonctionnel. Une fois mature, l'ostéoblaste va sécréter plusieurs enzymes et protéines tels que la phosphatase alcaline (ALP), le collagène de type1 (COLL1A1), l'ostéocalcine (OCN) ou encore la bone sialoprotein (BSP) qui permettent la synthèse et le remodelage de la matrice extracellulaire minéralisée (Capulli et al., 2014). (Figure 3B)

Les Ostéocytes : Ils représentent 95% des cellules osseuses et ils ont été longtemps considérés comme des ostéoblastes quiescents ; plus récemment, on les a identifiés comme étant « les chefs d'orchestre » de la production de matrice osseuse. Ils dérivent directement des ostéoblastes emprisonnés dans la matrice extracellulaire minéralisée. Durant les premiers jours de son emprisonnement dans la matrice, l'ostéoblaste va perdre progressivement son phénotype ALP<sup>+</sup>, OCN<sup>+</sup>, COLL1A1<sup>+</sup>, au profit d'autres marqueurs comme la dentin matrix protein1 (Dmp1) et Sost qui caractérisent ce nouveau type cellulaire (Capulli et al., 2014). Sa morphologie va également se modifier pour former des cellules avec de nombreux prolongements cytoplasmiques permettant à l'ostéocyte de communiquer avec les milieux adjacents à la matrice afin d'assurer ses différentes fonctions. Ils jouent un rôle dans la transduction des signaux mécaniques en signaux chimiques (Uda et al., 2017), et permettent une régulation de l'activité ostéoblastique et ostéoclastique (Bellido, 2014; Capulli et al., 2014). Par ailleurs, ils possèdent d'autres fonctions hormonales, notamment sur le métabolisme du rein (Martin et al., 2011) et sur le système immunitaire (Asada et al., 2013). (Figure 3C)

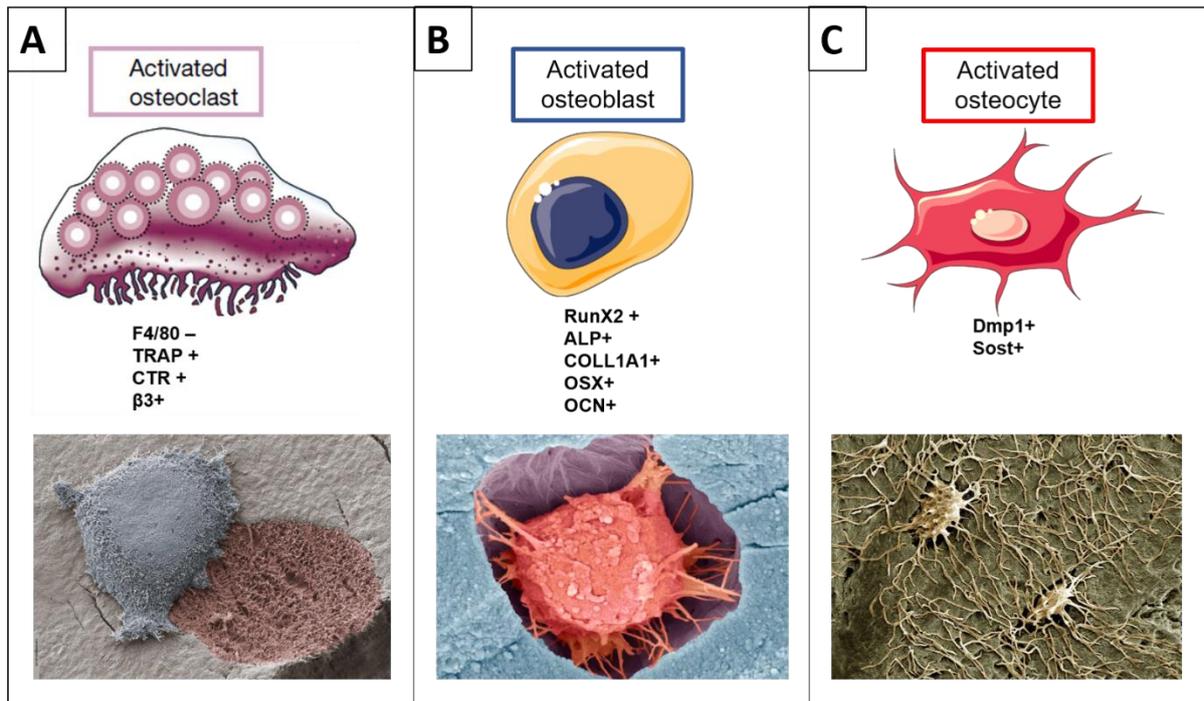


Figure 3: Les trois principaux types cellulaires présents dans le tissu osseux : A) Représentation schématique d'un ostéoclaste et de ses marqueurs phénotypiques (adapté de Boyle et al, 2003). Imagerie SEM d'un ostéoclaste (en gris) et de sa lacune de résorption (source : Arnett T Université du collège de Londres, <https://boneresearchsociety.org/resources/gallery/40/>). B) Représentation schématique d'un ostéoblaste et de ses marqueurs phénotypiques (adapté de Capulli et al, 2014). Imagerie SEM d'un ostéoblaste (en rouge) (source : Steve Gschmeissner 2013. Grossissement x8000 <https://fineartamerica.com/>). C) Représentation schématique d'un ostéocyte et de ses marqueurs phénotypiques (adapté de Capulli et al, 2014). Imagerie SEM de deux ostéocytes (en jaune) et de leurs prolongements cytoplasmiques (source : MacKenzie K, Université d'Aberdeen, Science Photo Library)

Les autres types cellulaires sont essentiellement présents dans le compartiment médullaire de l'os<sup>#</sup>. Ils forment des niches cellulaires composées d'adipocytes, de cellules souches hématopoïétiques, mégacaryocytes, macrophages, de MSCs, ou encore de cellules endothéliales composant la micro-vascularisation. D'autres cellules composant les artérioles ou les nerfs sont également présent dans le tissu osseux (Lucas, 2017).

## 2. Concept de l'ingénierie tissulaire

Le tissu osseux possède des capacités de cicatrisation, de réparation et de régénération intrinsèques après l'apparition d'une lésion grâce au remodelage osseux opéré par les ostéoblastes et les ostéoclastes. Cependant cette régénération naturelle a des limites en taille et en volume et la reconstruction des pertes osseuses massives reste un défi dans le domaine de la chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. A ce jour les techniques de référence utilisées en chirurgie pour réparer ces lésions sont l'utilisation de greffons autologues ou de biomatériaux d'origine naturelle ou synthétiques. Le manque de disponibilité de tissus pour la greffe et la faible bio-activité des matériaux à disposition a fait émerger dans les années 70/80 un nouveau concept appelé « l'ingénierie tissulaire ».

<sup>#</sup> Compartiment Médullaire : qui se rapporte à la moelle. Dans le cas présent il s'agit de la moelle osseuse présente dans la partie centrale de l'os dans le compartiment trabéculaire.

L'ingénierie tissulaire est une spécialité multidisciplinaire qui décrit l'ensemble des processus visant à fabriquer un tissu vivant, à partir des cellules de l'hôte cultivées *in vitro* sur un biomatériau tridimensionnel adapté, pour restaurer, maintenir ou améliorer une fonction. Pour cela, elle s'appuie sur les avancées dans les domaines des sciences du vivant et des biomatériaux afin d'améliorer le biomimétisme du greffon (Letourneur and Bordenave, 2017).(Figure 4)

Malgré son approche intéressante et novatrice, l'ingénierie tissulaire associant cellules/biomatériaux et facteurs de croissance reste à ce jour très peu utilisée chez l'homme en clinique. En effet, son coût de production élevé ainsi que les différentes contraintes exigées par les autorités sanitaires, laissent pour le moment, l'ingénierie tissulaire à l'état de concept utilisable comme modèle d'étude *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal. Seuls quelques produits d'ingénierie tissulaire ont été utilisés dans le cadre de cas cliniques.

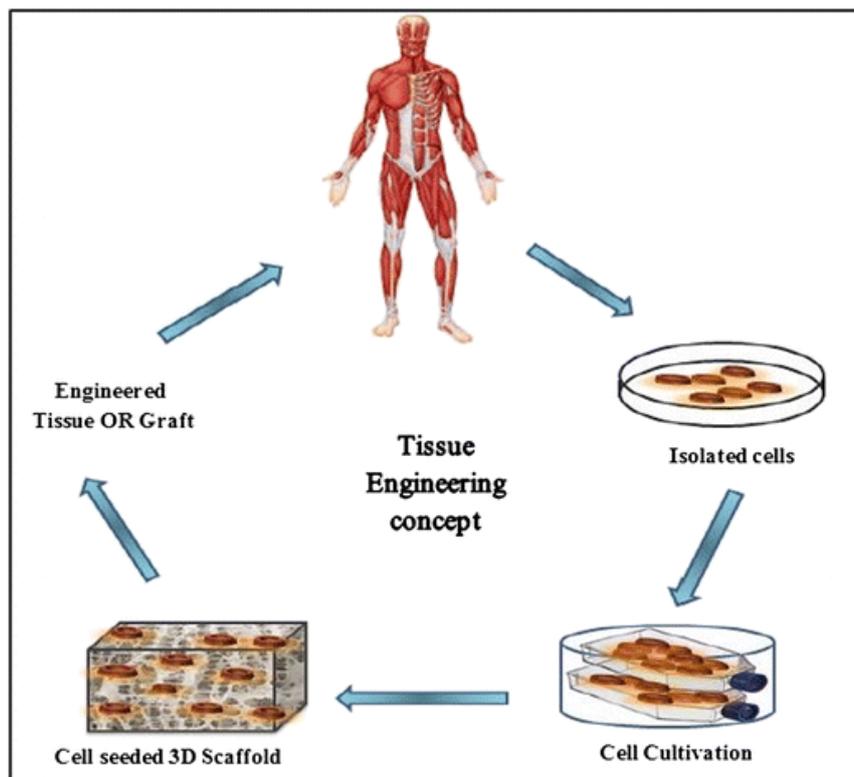


Figure 4: Concept de l'ingénierie tissulaire. Prélèvement des cellules du patient, culture de ces cellules *in vitro*, association des cellules avec un biomatériau et ré-implantation chez le patient. (Source : Pandey A R et al 2017)

## 2.1. Les cellules utilisées en bio-ingénierie du tissu osseux

Elles sont variées selon la complexité du produit d'ingénierie attendu, l'application et de l'hôte final (homme, gros animal ou petit animal). Nous pouvons distinguer d'une part les cellules issues de cultures primaires et d'autre part les cellules immortalisées modifiées génétiquement. Seules les cellules humaines ou dérivées de cellules humaines pour l'ingénierie du tissu osseux seront décrites dans le cadre de ce travail.

Les cellules primaires : Elles sont isolées à partir de tissus vivants par différentes techniques de digestion enzymatique ou chimique. De par leur nature peu proliférative, les cellules différenciées sont peu utilisées en ingénierie tissulaire. Seulement les cellules souches sont couramment utilisées car elles prolifèrent rapidement *in vitro* et sont multipotentes. Elles peuvent être isolées à partir de tissus minéralisés comme l'os ou la dent mais aussi de tissus mous comme le tissu adipeux riche en cellules souches mésenchymateuses. En ingénierie du tissu osseux, les cellules les plus utilisées sont

les ostéoblastes dérivant des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (hBMSCs). Ces hBMSCs ont une forte capacité de prolifération et sont facilement inductibles en pré-ostéoblastes *in vitro*. Les ADSCs sont également beaucoup employées, car elles ont les mêmes propriétés que les hBMSCs mais leur prélèvement est moins invasif. D'autres types cellulaires « MSCs-like » sont étudiés notamment pour des réparations dentaires et Maxillo-faciales comme les SCAPS ou les DPSCs qui sont prélevées et dérivées de la pulpe dentaire. Pour les études de résorption, les ostéoclastes utilisés sont obtenus à partir de cellules mononucléées du sang (PBMSCs) et elles sont cultivées avec du milieu de culture enrichi en M-CSF et RANK-L. (Tableau 1)

Les lignées cellulaires : Ce sont des cellules dérivées de cellules tumorales, modifiées par génie génétique ou spontanément devenues immortelles lors d'une culture *in vitro*. Elles ont la capacité de proliférer indéfiniment et expriment la plupart du temps, l'ensemble des marqueurs phénotypiques des cellules dont elles sont issues (Czekanska et al., 2014). La possibilité d'obtenir un grand nombre de ces cellules en culture facilement et rapidement a permis leur utilisation pour des études sur les biomatériaux : en effet, il est souvent nécessaire d'utiliser des concentrations cellulaires importantes pour ce type de cultures car l'adhésion cellulaire y est moins favorable comparativement aux plaques de culture en polystyrène classiques. (Tableau 1)

	Type cellulaire	Origine tissulaire ou cellulaire	Références bibliographiques
Cellules primaires	hBMSCs	Moelle osseuse	(Cordonnier et al., 2014; Li et al., 2010)
	ADSCs	Tissu adipeux	(Griffin et al., 2019; Lalande et al., 2011)
	SCAPs	Papille apicale dentaire	(Hu et al., 2018; Huang et al., 2009)
	hPLDSCs	Ligament parodontal	(Huang et al., 2009; Seo et al., 2004; Spagnuolo et al., 2018)
	DPSCs	Pulpe dentaire	(Hu et al., 2018; Huang et al., 2009)
	PBMSCs	Sang	(Arbez et al., 2019)
Lignées cellulaires	BMSC-TERT	Dérivé des BMSCs de souris	(Burns et al., 2010)
	MG63	Ostéosarcome	(Matinfar et al., 2019)
	MC3T3	Calvaria de souris	(Zheng et al., 2019)
	D1	Dérivé des BMSCs de souris	(Kalisky et al., 2016)
	IDG-SW3	Dérivé de cellules Dmp1-GFP de souris (Ostéocyte)	(Bonewald, 2013)

Tableau 1 : Quelques exemples de cellules primaires et de lignées cellulaires utilisées en ingénierie osseuse et leurs origines tissulaires ou cellulaires

## 2.2. Les facteurs de croissance en bio-ingénierie du tissu osseux

Les facteurs de croissance (FCs) sont des substances nécessaires à la cellule pour se multiplier, croître et acquérir des fonctions spécifiques lors de sa différenciation. Dans le cadre de l'ingénierie osseuse, les facteurs de croissance les plus couramment utilisés sont ceux intervenant dans les étapes de la réparation et du remodelage du tissu osseux. Ce processus repose sur un équilibre entre activité ostéoblastique et ostéoclastique (Figure 5). Durant les premières étapes de la réparation tissulaire, les cellules immunitaires vont sécréter différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF) qui vont stimuler l'angiogenèse et augmenter l'activité des ostéoclastes. En dégradant la matrice, ces derniers vont libérer d'autres FCs comme l'IGF et le TGFβ qui vont induire la différenciation ostéoblastique.

L'angiogenèse et la différenciation ostéoblastique vont se développer grâce à la communication entre cellules endothéliales productrices de BMP2 et les ostéoblastes qui vont synthétiser du VEGF. Puis la résorption osseuse va être modulée durant la phase de remodelage par la production de métalloprotéases comme RANKL, OPG (Nyberg et al., 2016; Qasim et al., 2019)

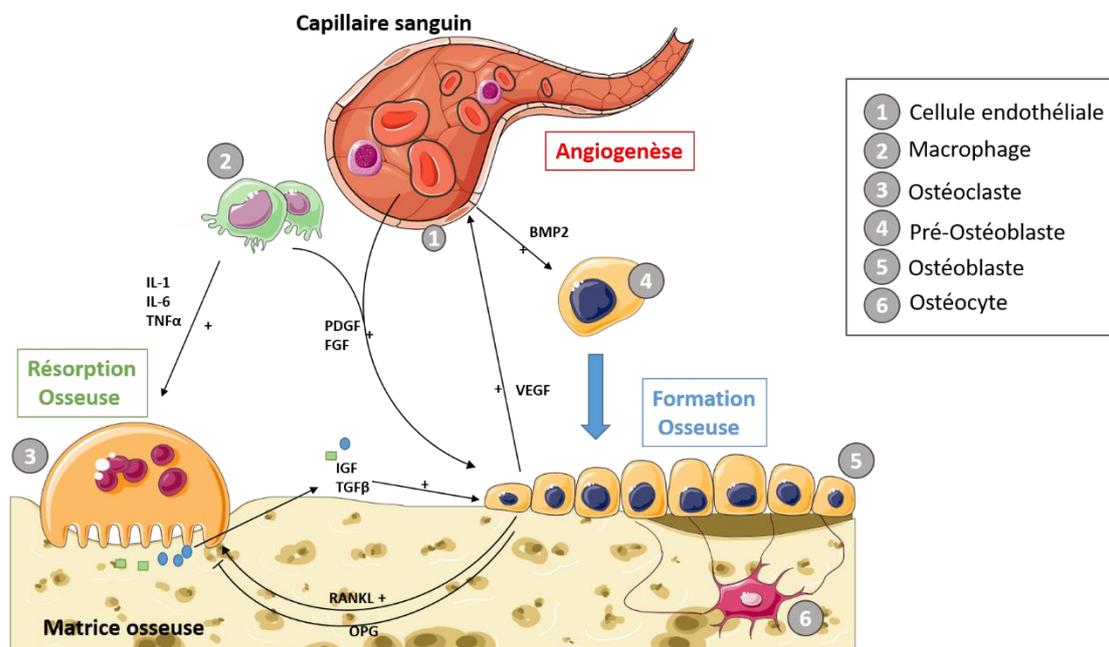


Figure 5 : Schéma de la communication cellulaire via les facteurs de croissance entre ostéoclastes, ostéoblastes et cellules endothéliales durant le remodelage osseux. (Réalisé à partir des travaux de Qasim et al 2019, Nyberg et al 2016)

Dans la stratégie de réparation du tissu par ingénierie tissulaire, les FC semblent avoir une place prépondérante de par leur activité biologique. Lors des premières études, les FC étaient directement injectés sur le site d'implantation en complément d'un biomatériau, mais ceci a montré peu d'efficacité du fait de la dégradation trop rapide des FC *in vivo*. (De Witte et al., 2018). De plus les FC peuvent diffuser en dehors du site d'intérêt et peuvent causer des effets secondaires indésirables (développement cancéreux, minéralisation en site ectopique #) (Martin and Bettencourt, 2018). Afin de pouvoir délivrer les FC de façon contrôlée dans le temps et l'espace, il est donc nécessaire de les immobiliser sur les biomatériaux et de maîtriser ainsi leur relargage sur le site d'implantation. Pour cela, 3 grandes stratégies sont utilisées avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients : 1) Immobilisation de façon covalente au matériau, 2) Adsorption directe sur le biomatériau avec des liaisons chimiques faibles, 3) Micro-encapsulation des facteurs de croissance. (Figure 6)

# Site ectopique : Site anormal pour une réaction physiologique

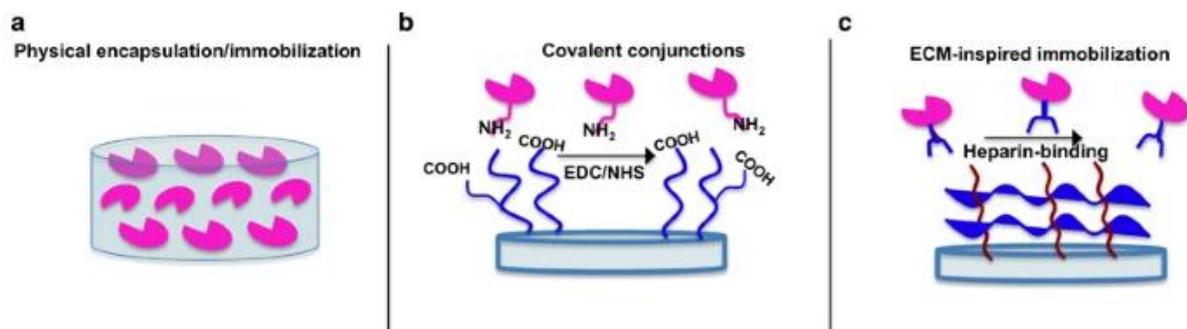


Figure 6: Schéma des différentes stratégies d'incorporation des facteurs de croissance dans un biomatériau. A) L'encapsulation de FCs. B) Immobilisation covalente des FCs avec le biomatériau. C) Adsorption directe des FCs avec des liaisons faibles et des interactions protéiques. (Source : Wang et al., 2017)

### 2.3. Les matériaux en bio-ingénierie du tissu osseux

Lorsque la lésion osseuse atteint une taille critique, suite à un traumatisme grave ou bien du fait d'une chirurgie d'exérèse carcinologique, le phénomène physiologique de réparation osseuse ne suffit pas toujours à réparer la lésion et les greffes autologues présentent des limites (morbidité au site donneur et quantité limitée). Ainsi, les biomatériaux sont fréquemment utilisés pour supporter et remplacer le processus naturel de réparation osseuse. Ces matériaux qu'il soient d'origine naturelle ou synthétique, doivent répondre à un cahier des charges très précis afin de remplacer les fonctions biologiques, chimiques et mécaniques de l'os et supporter la néoformation osseuse (Jordana et al., 2017). Plusieurs paramètres sont impliqués et ce matériau doit être :

- **Biocompatible** : c'est la capacité d'un biomatériau à fonctionner avec une réponse appropriée de l'hôte dans un champ d'application spécifique. Il ne doit pas être toxique pour l'hôte et doit répondre aux normes ISO 10993-5 (Naahidi et al., 2017).
- **Bioactif** : capacité à créer une interface et des liaisons entre le biomatériau et le tissu de l'hôte afin de faciliter l'ostéointégration.
- **Ostéoconducteur** : capacité du matériau à guider l'adhésion et la migration cellulaire en son sein, afin de favoriser la croissance osseuse.
- **Ostéoinducteur** : capacité du matériau à recruter des cellules mésenchymateuses indifférenciées par chimiotaxie, et de les orienter vers la voie ostéogénique et stimuler la formation d'os au sein du site d'implantation (Lalande, 2011). (Cependant, tous les biomatériaux utilisés pour la régénération osseuse ne sont pas ostéoinducteurs).
- **Poreux** : afin de permettre la colonisation cellulaire et la néo vascularisation. La porosité doit être de taille adaptée et les pores interconnectés pour permettre la migration, la prolifération cellulaire et la colonisation totale de la matrice, allant de la périphérie au centre de l'implant. Elle participe également à la meilleure diffusion des nutriments et de l'oxygène, permettant ainsi une meilleure survie et colonisation cellulaire.
- **Avoir des propriétés mécaniques adaptées** dépendantes du site d'implantation. En effet les contraintes mécaniques supportées par l'os mandibulaire et un os long comme le tibia sont différentes.
- **Résorbable** afin de permettre son remplacement progressif par le tissu osseux néoformé. La dégradation du biomatériau doit être connue et contrôlée. Elle doit se faire de façon concomitante à la néoformation osseuse. En effet, dans un premier temps le matériau doit servir de support aux cellules et au tissu néoformé, pour ensuite laisser la place au tissu mature.

### 2.3.1. Les matériaux naturels

Les matériaux naturels ont été les premiers matériaux utilisés en ingénierie tissulaire. Disponibles en grande quantité, ils ont permis les premières avancées dans le domaine de la substitution tissulaire. Ils proviennent d'espèces variées et leurs composantes peuvent être minérales ou bien organiques.

Dans le domaine osseux comme dans l'ensemble des autres tissus, le biomatériau naturel le plus utilisé demeure la greffe autologue qui représente le traitement de référence pour la régénération du tissu osseux. Elle est déjà cellularisée, non immunogène, biocompatible et respecte une grande partie du cahier des charges demandé pour un greffon. Cependant, la quantité d'os disponible est souvent limitée, et la morbidité du site donneur doit être également considérée. Ces limites ont poussé la recherche d'autres matériaux de substitution.

L'allogreffe<sup>#</sup> et la xénogreffe<sup>##</sup> » sont aussi utilisées mais nécessitent des traitements thermiques et chimiques afin de supprimer leur immunogénicité. Leur bonne ostéoconductivité fait d'eux de très bons matériaux utilisés en complément des greffes autologues lorsque celles-ci ne sont pas disponibles en quantité de greffon. Cependant leur pouvoir ostéoinducteur est très limité suite à la dénaturation cellulaire et protéique induite par les traitements (congélation, lyophilisation, stérilisation par irradiation). A cela se rajoutent le risque de transmission virale, d'infection bactérienne et des risques de rejet en dépit des traitements et des procédures de préparation des allogreffes. Parmi les principales sociétés présentes sur le marché nous pouvons citer la société OST Développement™ qui propose une gamme d'allogreffe pour la chirurgie dentaire (Allodyn©) (Figure 7A et B) et la société Geistlich Pharma™ qui propose des substituts xénogéniques d'origines bovines pour des applications en chirurgie dentaire et orthopédique (Bio-Oss© et Orthoss©).

Les xénogreffes présentent des propriétés ostéoconductrices intéressantes et sont disponibles en grande quantité et à plus faible coût que les allogreffes. Par exemple, Le corail est une xénogreffe, utilisée en réparation osseuse. En effet son squelette poreux, composé de carbonate de calcium, peut-être facilement transformé en hydroxyapatite par frittage et usiné à la forme souhaitée (Figure 7C). Il possède une bonne résistance aux forces de compression mais reste friable. (Jordana et al., 2017)

Les polymères naturels offrent une excellente biocompatibilité et une biodégradabilité par action enzymatique ou hydrolyse, et sont utilisés en recherche dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Ils sont souvent utilisés sous forme d'hydrogels associés à des éléments minéraux pour obtenir des matériaux composites. On distingue aussi des poly-osides tels que le Chitosane extraits à partir des carapaces de crustacés, composé de glucosamines et N-acétylglucosamines (Kozusko et al., 2018), ou encore d'acide hyaluronique ou de collagène de type 1 (Figure 7D).

---

<sup>#</sup> Allogreffe : greffe provenant d'un individu de la même espèce.

<sup>##</sup> Xénogreffe : greffe provenant d'un individu d'une espèce différente.

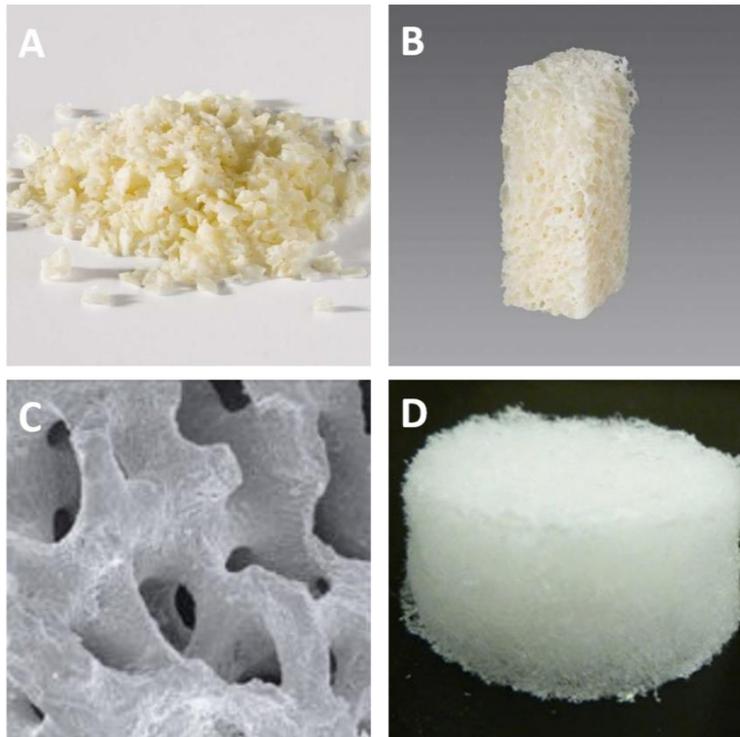


Figure 7 : Exemples de biomatériaux naturels. A) et B) Os allogénique sous forme de granulés ou de bloc pour des applications en chirurgie dentaire (source : <http://www.allodyn.com>). C) Squelette phosphocalcique de corail utilisé en greffe osseuse (source : [core-bone.com](http://core-bone.com)). D) Eponge de collagène (source : Castro-Cesena et al 2012)

Cependant, ces biomatériaux naturels présentent certains inconvénients comme par exemple un risque de rejet post implantation (souvent lié à l'induction d'une réponse inflammatoire non contrôlée) ou encore des propriétés mécaniques faibles (souvent observée avec les hydrogels) pour une application osseuse. De plus, la reproductibilité entre les lots peut également être un facteur limitant. Afin de standardiser ces résultats, les recherches se sont orientées vers le développement de biomatériaux totalement synthétiques : ceci permet de contrôler le processus de fabrication dans sa globalité et d'obtenir des matériaux possédant des propriétés mieux adaptées au site d'implantation.

### 2.3.2. Les matériaux synthétiques

Les matériaux synthétiques sont des biomatériaux entièrement fabriqués en laboratoire. Leurs caractéristiques physico-chimiques peuvent être largement modifiées et adaptées à l'application d'intérêt. Contrairement aux matériaux naturels, les matériaux synthétiques sont disponibles en grande quantité et auront tous les mêmes réponses biologiques s'ils sont issus d'une même synthèse. Ils permettent d'éviter le risque de propagation d'une infection inter-espèces et évitent tous problèmes d'ordre éthiques ou religieux (Jordana et al., 2017).

La modification des paramètres physico-chimiques tels que le pH, la rigidité, la rugosité de surface, la porosité peut modifier leurs propriétés biologiques comme la biocompatibilité, ainsi que leur bioactivité. D'autres paramètres peuvent aussi leur être conférés afin d'améliorer leurs qualités intrinsèques tels qu'un pouvoir antiseptique, la délivrance de substances actives, une dégradabilité contrôlée, ou encore une présentation sous forme injectable.

En ingénierie tissulaire osseuse, les quatre grandes classes de biomatériaux synthétiques sont : les céramiques, les métaux, les polymères et les composites (El-Meliegy and van Noort, 2012) (Figure 8).

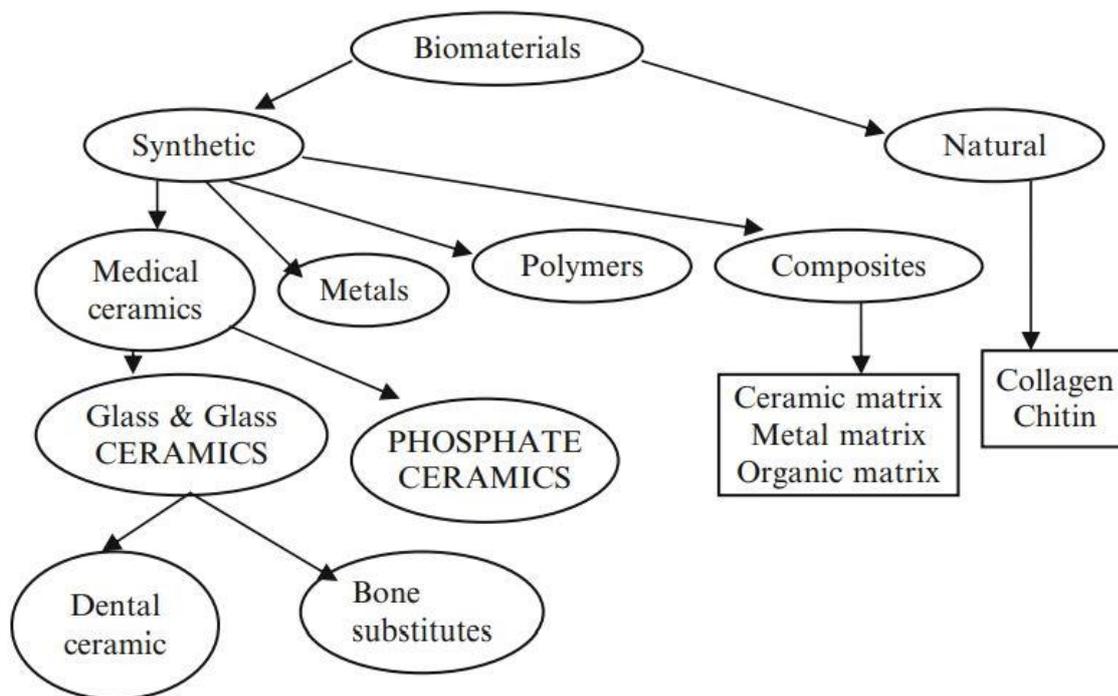


Figure 8: Classification des biomatériaux par El-Meliegy et von Noort, 2011

**Les céramiques** sont les principaux biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire osseuse avec comme avantage majeur, la ressemblance chimique à la structure minérale de l'os. Il en découle un caractère biocompatible, non toxique, et de bonne intégration au tissu hôte ; ces matériaux doivent également pouvoir être remodelés par le processus physiologique de remodelage osseux. Il a été démontré que les céramiques possédaient une capacité ostéoconductrice qui permet l'adhésion et la prolifération des ostéoblastes (Anselme, 2000). Dans certains cas, ces matériaux peuvent être ostéoinducteurs. La principale limite de ces matériaux est liée à leurs propriétés mécaniques car elles sont fragiles et possèdent une faible résistance à la fatigue (Dorozhkin, 2010). De ce fait elles sont principalement utilisées comme matériaux de comblement pour de petits défauts osseux ou comme revêtement de prothèses métalliques pour la chirurgie orthopédique et maxillo-faciale (Lu et al., 2019).

Parmi les céramiques on retrouve deux sous classes en fonction de la composition chimique : Les biocéramiques phosphocalciques et les biocéramiques silicatées (El-Meliegy and van Noort, 2012; Haugen et al., 2019).

Les céramiques composées de phosphates de calcium (CaP) sont les plus utilisées (Figure 9). Elles permettent de promouvoir une réparation osseuse rapide à leur surface grâce à leur composition chimique similaire à l'apatite naturellement présente dans l'os et grâce à leur capacité à libérer des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et des phosphates inorganiques qui stimulent la différenciation ostéoblastique (Thrivikraman et al., 2017). Elles sont souvent composées d'une association de plusieurs CaP conférant des propriétés de dissolution et de résistance mécaniques variables qui influencent directement l'ostéogénèse. Après une synthèse chimique en solution suivie d'une dessiccation<sup>#</sup>, ces céramiques sont frittées<sup>###</sup> afin d'être utilisées sous forme de blocs préformés ou de granules. Cependant les étapes de frittage rendent le matériau friable, diminuent sa solubilité et limitent sa biodégradabilité. De plus, il a été montré une

<sup>#</sup> Dessiccation : Elimination de l'humidité d'un corps

<sup>###</sup> Frittage : Procédé de fabrication consistant à souder des grains d'une poudre grâce à de hautes températures sans les mener à la fusion.

réduction du remodelage ostéoclastique et une limite de l'injectabilité de ce matériau lorsqu'il se présente sous forme de granules. Afin de pallier à ces inconvénients, Brown et Chow ont développé en 1983 un ciment phosphocalcique qui a la particularité d'être injectable est de durcir à 37°C avec une cinétique de prise contrôlable (Brown, 1983).

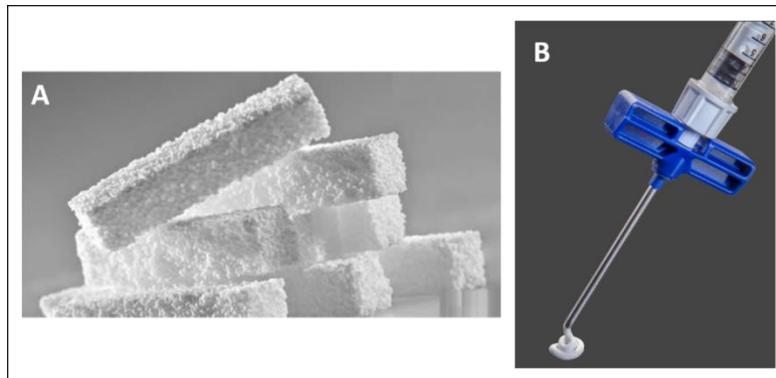


Figure 9 : Exemple de matériaux phosphocalciques. A) Bloc CERAFORM® de la société Teknimed composé de TCP et de HA. B) Ciment calcium phosphate Ossilix® de la société Exactech

Les biocéramiques silicatées ou bioverres sont des biomatériaux à base de silice, additionnés de phosphate de calcium. Le plus connu est le bioverre 45S5 inventé dans les années 70 par Hench *et al.* Il se compose de 45% de silicium, 24,5% de calcium, 24,5% de sodium et 6% de phosphore (Kaur *et al.*, 2014) et qui se présente sous forme de granules (Figure 10). Les bioverres sont connus pour réagir aux liquides physiologiques et former une couche d'hydroxyapatite carbonatée qui permet de stimuler la prolifération cellulaire et la différenciation de cellules souches vers un phénotype ostéoblastique. Cette couche va également être utile pour la minéralisation par les cellules osseuses et va permettre un lien fort avec l'os environnant (Thrivikraman *et al.*, 2017).

De la même façon que les céramiques phosphocalciques, la plupart des bioverres sont biocompatibles, ont des propriétés ostéoinductrices et favorisent l'invasion vasculaire. Cependant, ils présentent de faibles propriétés mécaniques (faible résistance à la fracture) et leur coût de production reste élevé. Ces éléments limitent leur utilisation aux sites opératoires soumis à de faibles contraintes mécaniques comme les chirurgies de comblements osseux de petits volumes (chirurgie orale et maxillofaciale par exemple). Actuellement en France, la société Noraker basée à Villeurbanne commercialise ce type de produit.

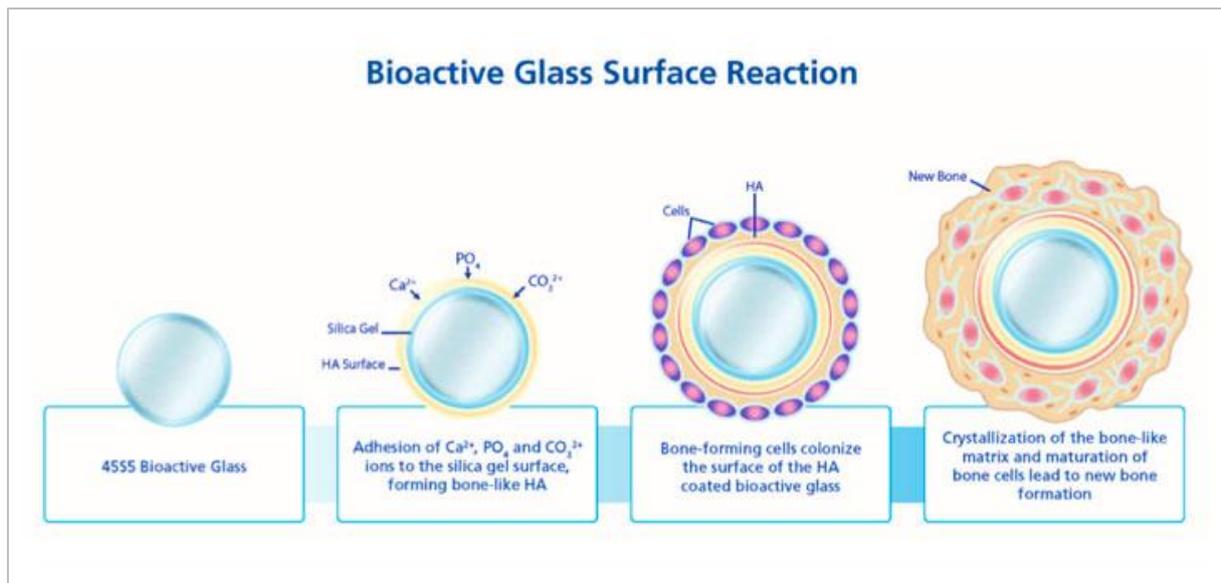


Figure 10: Représentation schématique de la Formation osseuse à partir d'un bio verre 4555 (source : [https://openwetware.org/wiki/Ceramic\\_Biomaterials,\\_by\\_Jon\\_Velez#Bioglass\\_and\\_Glass\\_ceramics](https://openwetware.org/wiki/Ceramic_Biomaterials,_by_Jon_Velez#Bioglass_and_Glass_ceramics))

**Les métaux**, et plus particulièrement les prothèses en métal sont utilisées depuis de nombreuses années dans beaucoup d'applications orthopédiques et dentaires. Grâce à leur grande rigidité, elles permettent le remplacement de certaines pièces anatomiques fortement sollicitées mécaniquement comme les prothèses de hanche, de rotule ou les implants dentaires. La composition en métaux de ces prothèses de substitution varie selon le besoin du site d'implantation et doivent répondre aux normes de biocompatibilité et à la corrosion. Les métaux les plus utilisés sont : le Titane de grade 4 (Ti-6Al-4V), le chrome/cobalt, zirconium (Farawati and Nakaparksin, 2019). Néanmoins les trois principaux problèmes rencontrés avec ce type de prothèses sont :

- Leur manque d'élasticité qui entraîne de fortes contraintes mécaniques sur le ciment de scellement et sur l'os en périphérie pouvant ainsi provoquer leur destruction à plus ou moins long terme
- Elles ne sont pas résorbables ce qui limite le remplacement prothétique par de l'os néoformé.
- La dégradation de ces métaux provoque le relargage de particules de corrosion, ce qui peut entraîner des réactions inflammatoires importantes péri-implantaires.

Cependant, les métaux ne sont pas uniquement utilisés sous forme de prothèses mais sont aussi utilisés sous forme d'oxydes pour modifier les propriétés des biomatériaux. Parmi eux, le strontium (Sr) a été décrit comme induisant l'ostéoblastogenèse en réduisant l'activité ostéoclastiques permettant ainsi de lutter contre l'ostéoporose (Saidak and Marie, 2012). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré un effet bénéfique sur la différenciation ostéoblastique de biomatériaux dopés au strontium (Zhang et al., 2020).

Les matériaux dopés avec des ions argent (Ag) présentent des caractéristiques antimicrobiennes et une biocompatibilité intéressantes pour le revêtement de matériaux (Khan et al., 2016).

**Les polymères** sont une catégorie de matériaux à part entière dont les composés sont très variés. Ils sont issus de l'assemblage de plusieurs monomères dont le nombre, l'enchaînement et les liaisons chimiques impliquées vont déterminer les propriétés physico-chimiques de

l'ensemble du matériau. Dans cette famille de matériaux, se regroupent les *résines thermoplastiques* comme le poly méthacrylate de méthyle (PMMA) utilisé pour le scellement des prothèses fémorales ou encore *les polyesters* qui sont les polymères synthétiques les plus utilisés en ingénierie osseuse (Ramesh et al., 2018).

Parmi les polyesters : l'acide polylactique (PLA), l'acide glycolique (PGA), le copolymère de ces deux derniers (PLGA) et le polycaprolactone (PCL) (Figure 11) sont les matériaux les plus représentés car ils sont faciles à synthétiser et sont biocompatibles (Neto and Ferreira, 2018). Leur durée de vie dans l'organisme de 12 à 24 mois est adaptée au temps de reconstruction osseuse. Les produits de dégradation tels que l'acide lactique ou l'acide glycolique du PLA et PGA sont des métabolites naturellement présents dans l'organisme et peuvent être facilement éliminés par les voies naturelles (Fonseca et al., 2014). Mais, l'accumulation de ces mêmes métabolites peut entraîner localement une diminution du pH et provoquer de l'inflammation. Ces matériaux peu coûteux ont trouvé un véritable regain d'intérêt d'utilisation au cours de ces vingt dernières années grâce au développement des techniques d'impression de matériaux en 3 dimensions tels que l'électrospinning ou la FDM (Fused Deposition Modeling) (Contreras-Cáceres et al., 2019). Cependant, leurs propriétés mécaniques (résistance à la traction et élasticité) sont assez faibles et nécessitent souvent d'être optimisées par l'ajout d'un copolymère.

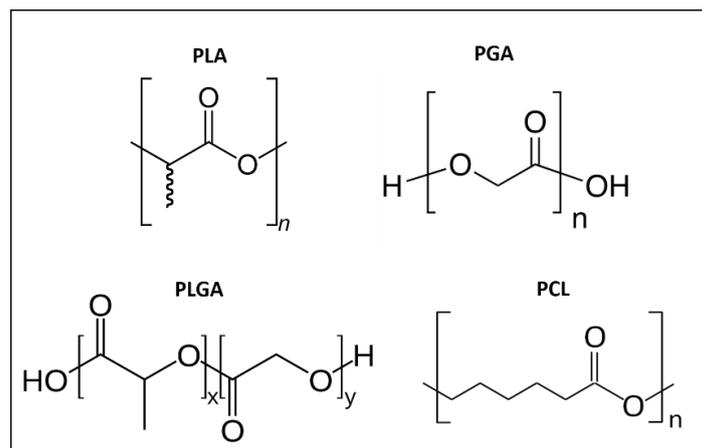


Figure 11: Structure chimiques des principaux polymères synthétiques utilisés en ingénierie osseuse.

**Les matériaux composites** sont des matériaux synthétiques associant plusieurs matériaux. La création de matériaux composites permet de contrebalancer les limites de chacun des matériaux décrits. Ce mélange de composés permet d'acquérir les propriétés physico-chimiques qu'un matériau simple ne pourrait avoir à lui seul. Pour cela, on retrouve différents types d'associations. (Babilotte et al., 2019)

Ainsi par exemple, l'adjonction d'une phase minérale comme l'hydroxyapatite (HA) à des matériaux synthétiques comme le PLA et le PCL permet d'obtenir un matériau ayant plusieurs caractéristiques attendues en ingénierie du tissu osseux. Le PLA est biocompatible, rapidement bio-résorbable et approuvé par la FDA (Food and Drug Administration)<sup>#</sup>. En lui ajoutant du PCL, le PLA devient moins cassant et son temps de dégradation est allongé permettant ainsi une néoformation tissulaire. Ces deux matériaux sont usinables sous forme de fibres utilisables avec une imprimante 3D, permettant de créer des "scaffolds" (échafaudages) dont l'architecture est contrôlée. L'ajout de HA permet

<sup>#</sup> FDA (Food and Drug Administration) : c'est l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments. Cet organisme a l'autorité pour la mise sur le marché des médicaments sur le territoire américain.

d'augmenter le potentiel ostéoinducteur du matériau et améliore donc la formation osseuse. (Pitjarnit et al., 2020).

Une autre étude montre un matériau composite permettant de combiner les propriétés ostéoinductrices de bioverres, à celles de photopolymérisation de la gélatine métacrylée (GelMA) et aux effets antimicrobiens du lithium (Moghanian et al., 2020). L'idée étant d'utiliser la GelMA pour créer l'architecture globale du matériau. Les bioverres induisent l'ostéoinduction et améliorent les propriétés mécaniques de la gélatine. Cependant, ils ont tendance à créer localement des chocs osmotiques et une baisse de pH qui favorisent le développement des souches bactériennes anaérobies. Afin de limiter cette propagation bactérienne, les bioverres sont directement dopés avec du lithium connu pour ses effets antibactériens.

Cependant, la mise sur le marché des biomatériaux composites reste très complexe car il est nécessaire de prouver que tous les composés, utilisés ensemble et séparément, sont bien biocompatibles selon la norme ISO 10993/EN 30993.

### 3. Les approches conceptuelles en Ingénierie Tissulaire

Depuis ses débuts et jusqu'à aujourd'hui, l'ingénierie tissulaire a su se réinventer sous l'impulsion des connaissances acquises et de l'évolution technologique. Initialement, le dogme a été de penser qu'il suffisait de créer un environnement matriciel biomimétique suffisamment attractif pour que les cellules puissent adhérer, se multiplier puis remodeler le biomatériau. Telle est l'approche classique dite « top-down ». Vers la fin des années 2000, la prise en compte non plus de l'environnement matriciel dans son ensemble, mais du microenvironnement cellulaire a fait évoluer le concept vers l'approche « bottom-up » qui vise à une hiérarchisation plus fine du greffon synthétique (Figure 12).

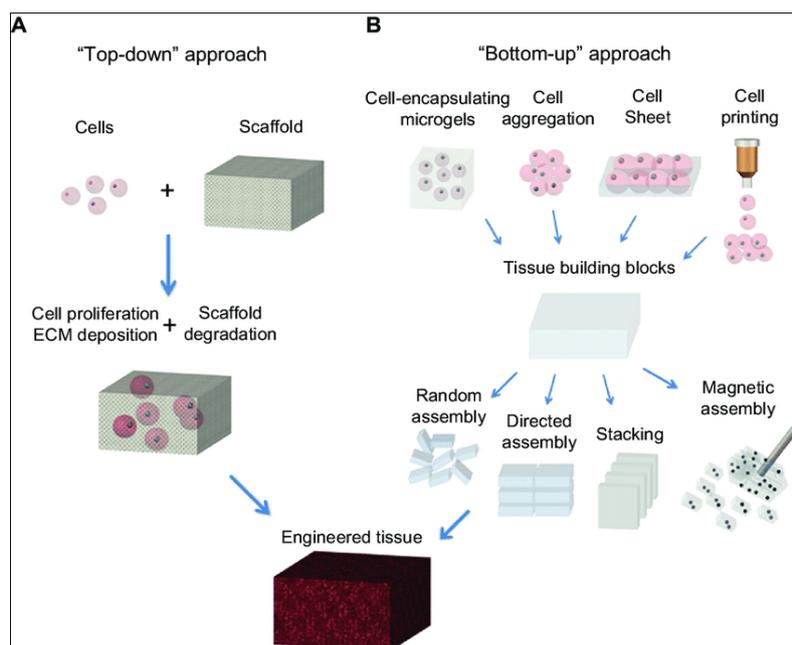


Figure 12: Approche conceptuelles en ingénierie tissulaire. A) « Top-down » et B) « Bottom-up ». (Source : Lu T et al 2013 adapté d'après les travaux de Nichol et Khademhosseini 2009)

### 3.1. L'approche « top-down »

C'est l'approche traditionnelle, assez simple de mise en œuvre où les cellules sont directementensemencées en surface du matériau (Figure 12A). Dans cette approche on attend une colonisation spontanée du matériau par les cellules lors de l'étape de maturation. Après une période donnée, les cellules prolifèrent, créent leur propre matrice tout en dégradant celle que constitue le scaffold. Cette approche a trouvé son écho dans les domaines d'application tissulaire ne nécessitant que peu de cellules et/ou peu de vascularisation comme par exemple la peau, la vessie ou le cartilage (Lu et al., 2013).

La méthode dite « top-down » s'appuie sur deux méthodes de travail. La première consiste à pré-cellulariser le matériau *in vitro* avec les cellules du patient. Après une période de maturation, il est implanté sur le site opératoire puis remodelé *in vivo*. Cependant la phase de maturation *in vitro* est longue, coûteuse, nécessite deux étapes et les cellules amplifiées *in vitro* peuvent développer des anomalies génétiques telles que des trisomies (Thébaud et al., 2015). La deuxième méthode consiste à planter un matériau qui va « recruter » directement les cellules du patient comme par exemple les MSCs et les faire différencier. Cette méthode est la plus utilisée en clinique car elle ne nécessite qu'un temps opératoire et la mise sur le marché d'un tel produit est plus « simple » car elle n'entre pas dans le cadre de la thérapie cellulaire (Nemeno-Guanzon et al., 2012).

Qu'elle se fasse avec une précellularisation ou non, cette approche présente un inconvénient majeur pour la diffusion des nutriments au sein du matériau, du fait d'un manque de vascularisation. Il en résulte une distribution cellulaire inhomogène et une viabilité cellulaire faible au cœur du scaffold. En effet, la diffusion passive des nutriments ne dépasse pas 200 µm de profondeur. La vascularisation nécessite une taille de pores supérieure à 250 µm pour se développer. Malgré les avancées en terme de fonctionnalisation de surfaces et de biomimétismes ces approches aboutissent difficilement à la récréation du microenvironnement complexe, favorable et caractéristique du tissu à réparer (Lu et al., 2013; Rouwkema et al., 2008).

### 3.2. L'approche « bottom-up »

Grâce au développement des matériaux composites et des nouvelles technologies d'assemblages, l'approche de fabrication couche par couche ou « bottom-up » vise à résoudre les problématiques avec l'approche traditionnelle (Figure 12B). Elle consiste donc à développer le micro-environnement de chaque type cellulaire composant le greffon de façon séparée puis de les assembler afin de créer un macro environnement modulable et implantable (Nichol and Khademhosseini, 2009). Pour la réalisation de ce concept, l'utilisation de plusieurs technologies et de divers matériaux ont été décrites afin de répondre aux besoins de chaque type cellulaire. Comme exposé dans la Figure 12B, les sous unités peuvent être créées soit à partir de cellules encapsulées dans des hydrogels, soit cultivées en organoïdes ou cultivées en feuillets, mais aussi imprimées via une imprimante 3D. Enfin, les différentes sous-unités sont assemblées physiquement de façon hiérarchisée ou non. L'une des difficultés est de maintenir la cohésion des unités du scaffold. La stabilité de ces assemblages est cruciale pour éviter d'endommager les cellules, mais aussi pour faciliter leur manipulation et éviter les mouvements après implantation.

## 4. La Bio-Impression

La bio-impression (ou 3D bioprinting) est une technologie appliquée au biomédical qui a fait son apparition à partir de la fabrication additive. L'une des premières apparitions de l'impression 3D dans le domaine de la recherche médicale a concerné l'utilisation de l'impression 3D pour réaliser des modifications de surface d'un matériau permettant ainsi une l'adhésion cellulaire spécifique. (Park et al., 1998)

Cette discipline a pris une ampleur considérable ces dernières années, appuyée par une quantité croissante de publications, grâce notamment au développement d'outils informatiques permettant de modifier les approches en ingénierie tissulaire :

- Adaptation de l'architecture et de l'ultrastructure du scaffold de manière à l'adapter au mieux à la réponse biologique ou au site d'implantation
- Répartition des éléments biologiques de façon homogène et hiérarchisée dans le scaffold (Hong et al., 2018). La bioimpression se base sur le principe de la CAO (conception assistée par ordinateur) avec des paramètres contrôlés où le manipulateur modélise un matériau dans un logiciel, puis l'imprimante pilotée par l'ordinateur le construit couche par couche grâce à une « encre » spécifique ;

Cette technique offre la possibilité de reproduire la complexité d'un tissu de façon plus avancée que les techniques de médecine régénérative actuelles

Marginalement utilisée au début des années 2000, elle a commencé à trouver un intérêt auprès des chercheurs au cours de ces cinq dernières années grâce au développement de l'approche « bottom up » et à la diminution du coût des machines (Figure 13). Ces trois dernières années, il a été mis en ligne sur Pubmed environ 1000 documents scientifiques contenant des éléments associés à la bio impression faisant de cette technologie une des priorités nationales auprès de l'INSERM.

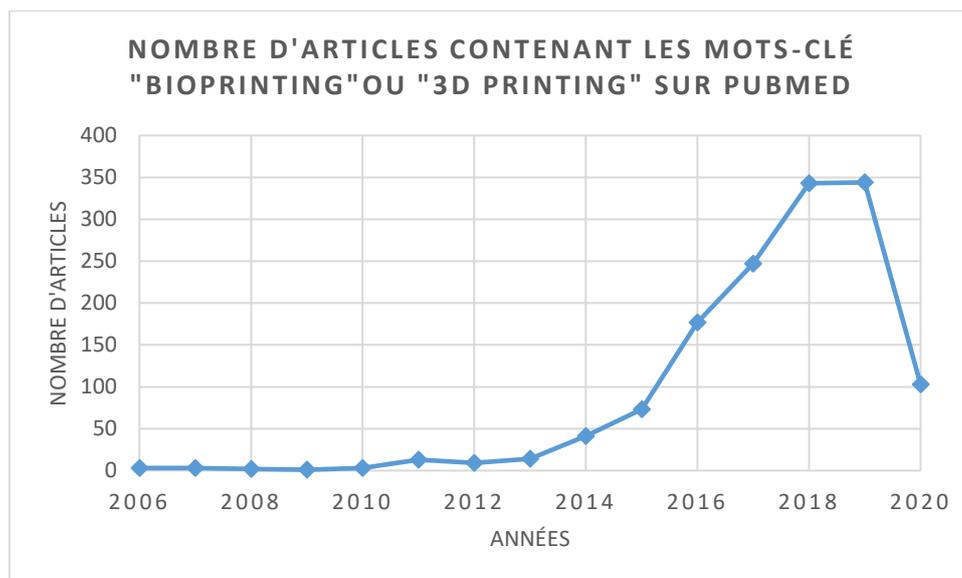


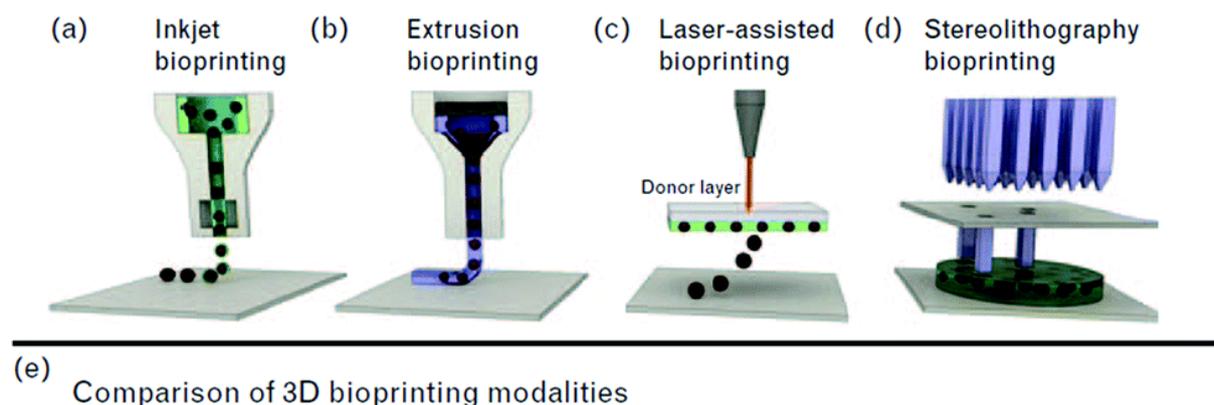
Figure 13: Représentation graphique du nombre de publications scientifiques parues sur PubMed contenant les mots clé « Bioprinting » ou « 3D printing » depuis 2006

En 2017, l'INSERM a créé à Bordeaux dans l'unité INSERM U1026 «Biotis » un Accélérateur de Recherche Technologique entièrement dédié au développement de la bio-impression (ART « Bioprint ») qui a pour buts de : 1) Développer des projets et former les autres unités INSERM sur la bio impression, 2) Accélérer le développement de modèles tissulaires pour la recherche dans le domaine de la médecine régénérative et 3) Valoriser l'utilisation de la technique du bioprinting auprès des autres unités de Recherche (source : biotis-bordeaux.com). A ce jour, c'est la seule unité en France dotée des trois principales techniques de bioimpression.

#### 4.1. Les différentes techniques de bio-impression

Il existe plusieurs techniques de fabrication utilisables en ingénierie tissulaire qui diffèrent par le procédé de mise en forme de la matière mais également par la nature des matériaux utilisables. Elles permettent une impression avec plus ou moins de précision de cellules incluses dans ce que l'on appelle bioencres.

Les principales techniques de bioimpression sont au nombre de quatre : l'impression par jet d'encre, la micro extrusion, l'impression assistée par laser et la stéréolithographie (Figure 14).



	Inkjet	Extrusion	Laser assisted	Stereolithography
Ink viscosity	3.5–12 mPa/s	Up to $6 \times 10^7$ mPa/s	1–300 mPa/s	No limitation
Cell density	Low, $<10^6$ cells/ml	No limitation	Medium, $<10^8$ cells/ml	No limitation
Resolution	High	Moderate	High	High
Print speed	Fast	Slow	Medium	Fast
Cost	Low	Medium	High	Low

Figure 14: Représentation schématique des 4 principales technologies utilisées en bioimpression et leur comparaison par Donderwinkel et al 2017. A) Principe de l'impression par jet d'encre. B) Principe de la micro-extrusion. C) Principe de l'impression assistée par laser. D) Principe de l'impression par stéréolithographie. E) Tableau comparatif des capacités d'impression des 4 technologies.

Chacune de ces technologies présente des avantages et des inconvénients mais elles permettent toutes d'imprimer des éléments biologiques. L'échelle de résolution va de la dizaine de microns

(bioimpression assistée par laser) jusqu'à plusieurs cm pour la microextrusion. La complémentarité de ces technologies permet donc d'envisager l'impression hiérarchisée d'un tissu dans son ensemble.

#### 4.1.1. Impression par technologie à jet d'encre

L'impression par jet d'encre ou inkjet en anglais (Figure 14A) est une méthode d'impression sans contact entre la source donneuse (la seringue contenant la bio-encre) et le support receveur. L'encre contenue dans la seringue passe à travers la tête d'impression selon une fréquence déterminée. Ce mécanisme peut être une cellule thermique ou piézoélectrique (Figure 15). Le déplacement de la tête d'impression, permet de générer des gouttes d'encre qui vont se déposer sur le support receveur. Ainsi la taille des gouttes peut être contrôlée par la fréquence d'ouverture de la cellule mécanique et par la vitesse de déplacement de la tête d'impression.

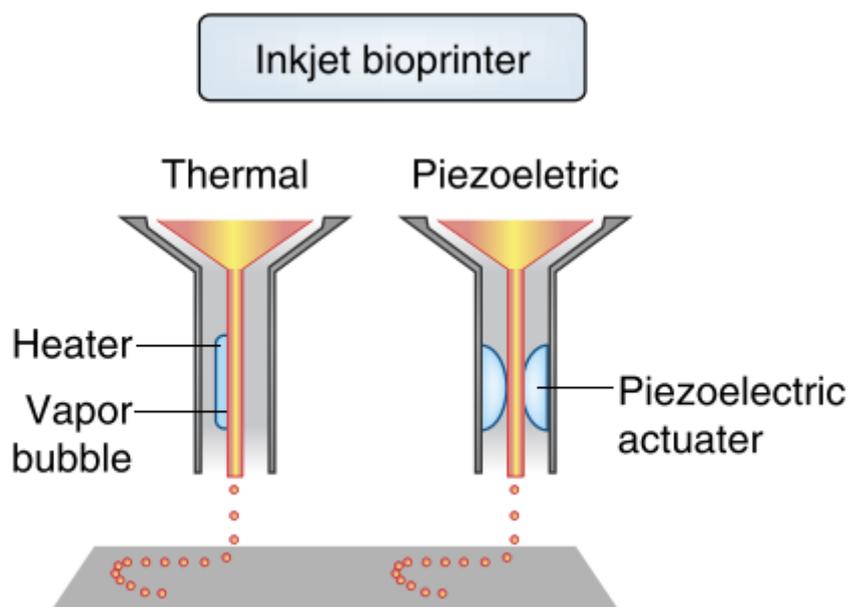


Figure 15: Représentation schématique des deux systèmes de technologie d'impression à jet d'encre. (Murphy and Atala, 2014)

Cette technologie de haute résolution permet de générer des gouttes allant de 20 à 60  $\mu\text{m}$  de diamètre pour des volumes d'éjection de 10 à 150  $\mu\text{L}$ . Ces valeurs dépendent directement des réglages de la machine mais aussi de la viscosité de la bioencre. Cette bioencre doit être relativement peu visqueuse afin de ne pas boucher la seringue : ceci entraîne notamment une limite dans la densité cellulaire imprimable ainsi qu'une limitation des structures verticales. (Figure 14E) (Angelopoulos et al., 2020; Derakhshanfar et al., 2018)

#### 4.1.2. Impression par Micro-extrusion

L'impression par micro-extrusion est la technologie la plus répandue et la plus documentée dans la littérature scientifique de fait de son coût financier réduit et de sa technologie plus simple.

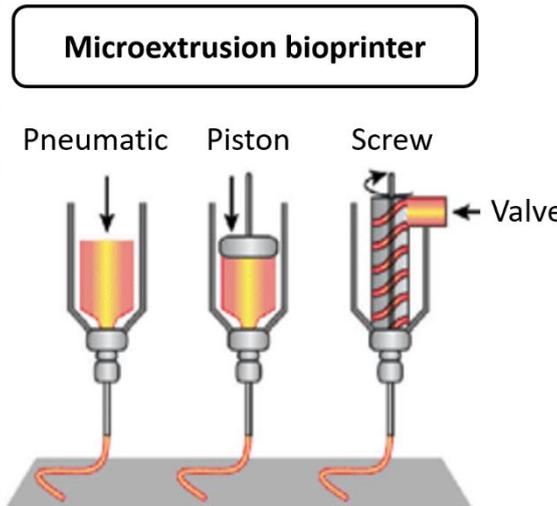


Figure 16 Représentation schématique des trois systèmes de technologie d'impression par micro-extrusion. (Murphy and Atala, 2014)

Cette méthode d'impression nécessite des matériaux avec des caractéristiques d'impression particulières dont la viscosité est un des paramètres clés. La technologie repose sur le principe de dépôt par contact direct entre le matériau déposé et son substrat receveur. Le matériau contenu dans une cartouche est mis sous pression et passe au travers d'une aiguille (ou un cône) dont le diamètre interne conditionne en partie le diamètre de l'extrudât (diamètre de 100 à 1000  $\mu\text{m}$ ). Le système de mise sous pression varie selon le modèle de l'imprimante et peut se faire soit à l'aide d'un système par pression d'air, soit grâce à un piston ou bien par l'intermédiaire d'une vis sans fin (Figure 16).

La micro-extrusion permet d'imprimer des encres cellularisées ayant une viscosité importante (de l'ordre du kPa/s). Cette technique permet donc d'imprimer des encres avec une forte densité cellulaire. Contrairement à la technologie inkjet, la micro-extrusion engendre beaucoup plus de forces mécaniques sur les cellules, ce qui a un impact sur la viabilité cellulaire. (Dai and Lee, 2015)

#### 4.1.3. Impression assistée par laser (LAB)

L'impression assistée par laser a pour principe d'utiliser l'énergie d'un laser afin de transférer une bio-encre d'un support donneur vers un support receveur. Pour cela, un laser pulsé nano ou femto-seconde est focalisé sur une lame donneuse recouverte d'une fine couche métallique et d'une encre cellulaire. L'énergie photonique absorbée par la couche de métal est restituée à l'interface avec la bio-encre sous forme d'énergie thermique. L'augmentation de la température localement génère une bulle de vaporisation qui expulse un jet d'encre en direction d'une lame receveuse située à quelques millimètres de la première. Comme pour la technologie inkjet, le dépôt ne se fait pas par contact direct entre le support donneur et le support receveur (Fricain et al., 2017) (Figure 17).

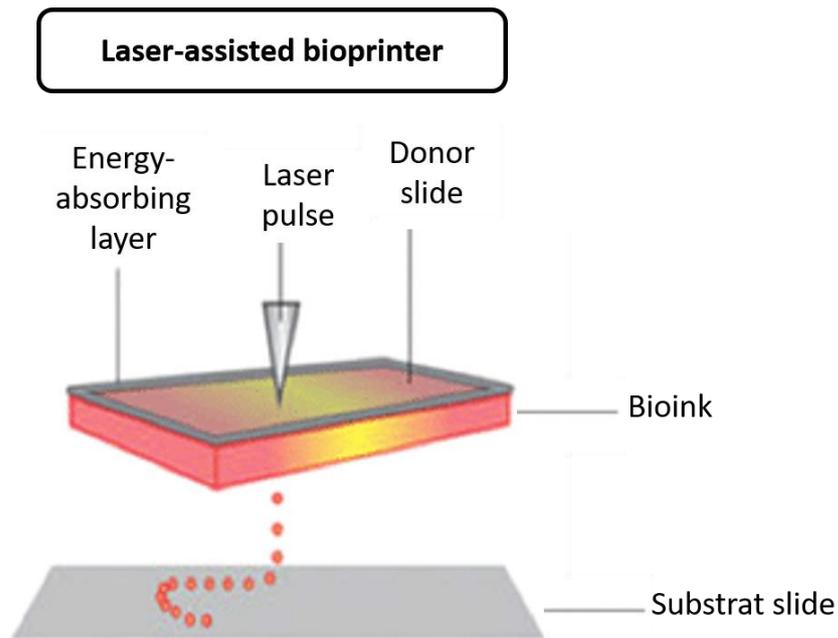


Figure 17: Représentation schématique de l'impression assistée par laser (Murphy and Atala, 2014)

Cette technique possède une haute résolution et elle présente l'avantage de pouvoir réaliser des niveaux d'organisation à l'échelle micrométrique en imprimant des gouttelettes contenant une dizaine de cellules, tout en maintenant une très bonne viabilité. Néanmoins, le coût important d'un tel équipement, la difficulté à optimiser tous les paramètres en jeu (comme l'énergie du laser et la distance substrat/receveur) sans oublier que l'utilisation de bio-encre faiblement visqueuses limitent l'utilisation de cette technique à des applications très spécifiques. (Derakhshanfar et al., 2018)

#### 4.1.4. La Stéréolithographie (SLA)

La Stéréolithographie ou SLA a été inventée en 1984 par Charles Hull. Son principe repose sur l'utilisation de résines photo-polymérisantes qui sont polymérisées couche par couche pour obtenir un objet 3D. Pour ce faire, le laser est déplacé en fonction de la forme choisie à la surface d'un bac contenant le polymère photosensible qui durcit au contact de la lumière. Après la polymérisation de chaque couche, la plateforme support descend de quelques micromètres, le polymère liquide recouvre la précédente couche durcie puis à son tour, est polymérisé par la lumière. Ainsi, de couche en couche, l'objet est reconstruit en 3 dimensions (Figure 18).

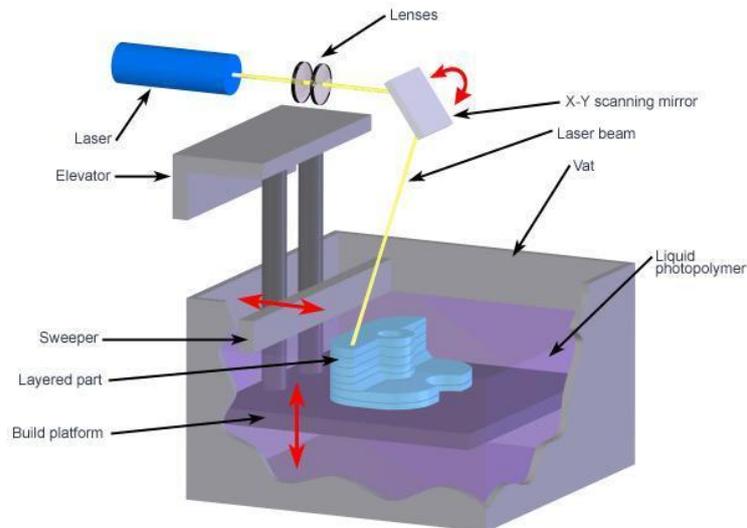


Figure 18: Représentation schématique de l'impression par stéréolithographie (source : <https://www.a3dm-magazine.fr/news/fabrication-additive-polymeres/limpression-3d-stereolithographie-sla>)

Cette technique a de nombreux avantages car elle permet une impression rapide à faible coût avec un grand degré de précision. Elle permet aussi de générer des constructions verticales tout en préservant une bonne viabilité cellulaire. Malgré ses nombreux avantages, cette technologie présente quelques inconvénients dont l'impossibilité d'organiser plusieurs types cellulaires, d'utiliser des rayons UV potentiellement toxiques pour les cellules et d'utiliser exclusivement des polymères photosensibles. (Derakhshanfar et al., 2018)

## 4.2. La bio-impression dans le domaine de l'ingénierie osseuse

### 4.2.1. Impression 3D ou bio-impression ?

De par son rôle structural, l'os est un tissu qui a toujours nécessité l'utilisation de biomatériaux possédant des propriétés mécaniques importantes pour sa substitution et sa régénération. A ses débuts en 1984 avec l'invention de la SLA, l'impression 3D a privilégié dans un premier temps le développement des technologies permettant l'élaboration d'objets en 3D rigides. SLA avec des résines polymérisables, frittage laser sélectif, FDM, DMLS sont autant de techniques d'impression 3D qui permettent l'obtention d'un objet solide.

Sur ces bases, les applications de l'impression 3D dans le domaine médical et en ingénierie tissulaire se sont rapidement orientées vers le tissu osseux. En 2009, une prothèse de mâchoire en  $\alpha$ TCP réalisée grâce à l'impression 3D a été implantée (Saijo et al., 2009). Puis en 2013, c'est l'implantation chez une patiente de 22 ans d'un crâne en plastique obtenu par impression 3D qui a été réalisé. (Brisson and Marquette, 2020) (Figure 19).

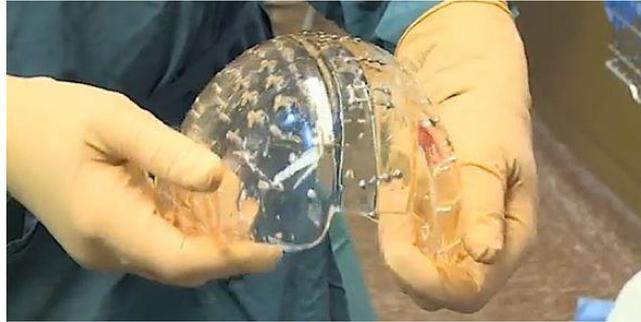


Figure 19: Crâne en plastique obtenue par impression 3D et implanté en 2012 par le Dr Bon Verweij. Université d'Utrecht, Pays-Bas.

Cependant, il est important de ne pas confondre l'utilisation de l'impression 3D au service de l'ingénierie tissulaire et la bio-impression dans le domaine de l'ingénierie osseuse. En effet, si la différence sémantique peut paraître dérisoire, elle pose une réelle question au moment de faire l'état de l'art dans le domaine.

Une rapide recherche bibliographique sur Pubmed en associant les mots clés « : *nom du tissu* » + « 3D printing » ou « bioprinting » (Figure 20) montre que sur les 20 dernières années, la fabrication additive a surtout pris une place dans la préparation de scaffolds auxquels sont associés manuellement des cellules. Dans ce cas, l'impression 3D n'est qu'une avancée technologique dans la préparation d'un matériau qui, comparé aux techniques classiques de préparation de matériau par moulage, permet d'obtenir une microarchitecture plus contrôlée. Mais elle ne permet pas de répondre totalement aux limitations constatées depuis de nombreuses années dans le domaine de l'ingénierie tissulaire comme par exemple, l'organisation précise des cellules entre elles ou encore la diffusion limitée des nutriments et O<sub>2</sub> au cœur du scaffold par manque de néovascularisation.

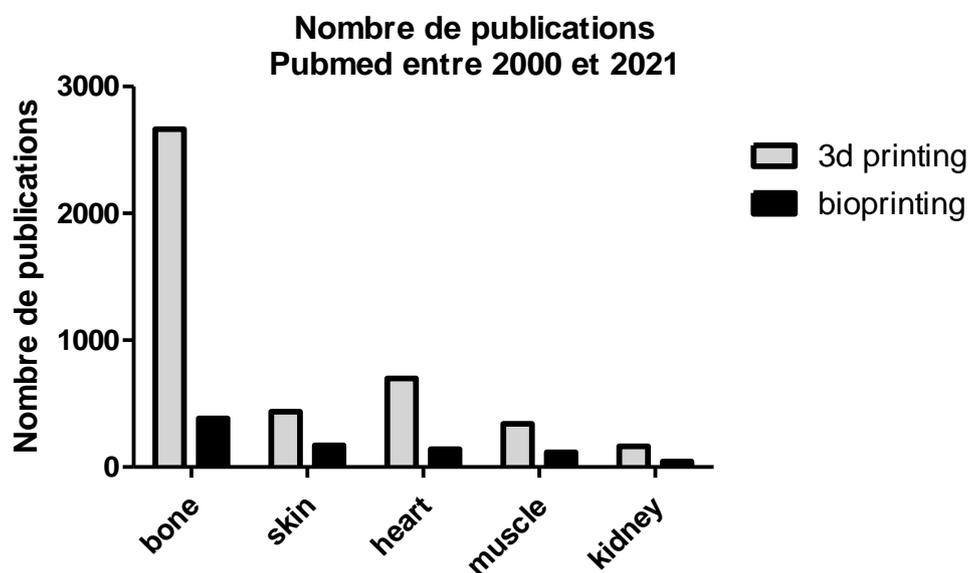


Figure 20: Graphique représentatif de la recherche bibliographique sur Pubmed montrant le nombre de publication pour différents tissus en fonction du mot clé associé.

La bio-impression se définit quant à elle, comme la déposition contrôlée par impression 3D d'éléments biochimiques, d'éléments structuraux et d'éléments cellulaires vivants. Elle se différencie donc de l'impression 3D par l'utilisation d'une seule et même machine pour la réalisation de l'ensemble de ces tâches. Elle doit permettre d'imprimer simultanément le scaffold et les cellules (Derby, 2012).

Afin de mieux comprendre les avancées scientifiques dans ce domaine, il faut donc intégrer la notion de bio-encre qui peut être considérée comme une sous-classe bien distincte de biomatériaux due à leur habilité à être imprimée en 3D sans nécessité d'un support externe. Les 3 principales caractéristiques que doit posséder une bio-encre sont : 1- Sa capacité à être imprimée de façon contrôlée pour former un extrudât cylindrique ou une gouttelette rigide, 2- Etre suffisamment visqueuse pour se maintenir dans le réservoir avant l'impression et 3- Être capable de se rigidifier après impression afin de maintenir la forme lors de l'impression des couches successives (Thayer et al., 2020).

A partir des propriétés d'une bio-encre, on peut se demander comment travailler avec des bio-encres liquides, plus ou moins visqueuses et possédant de faibles propriétés mécaniques dans un domaine de recherche ayant pour objectif de reconstruire un tissu dur soumis à de fortes contraintes mécaniques ? Comment la bio-impression peut-elle trouver un essor dans le domaine de l'ingénierie osseuse ?

#### 4.2.2. L'évolution de la bio-impression en ingénierie osseuse

A la fin de la première décennie des années 2000, deux principales approches de bio-impression ont été développées en parallèle.

La première approche proposée par Fedorovich *et al* en 2008 a consisté à construire un scaffold en utilisant une encre cellulaire. Celle-ci était composée d'alginate et des HBMSCs. Cette équipe a montré qu'il était possible d'imprimer des cellules par micro extrusion en préservant la viabilité cellulaire et que ces cellules se différenciaient en présence d'un milieu ostéo-inducteur (Fedorovich et al., 2008).

Une deuxième approche consistait à utiliser la bio-impression en utilisant une encre, acellulaire, chargée en facteurs de croissance permettant ainsi le recrutement et/ou la différenciation des cellules vers un lignage ostéoblastique. En utilisant la technologie inkjet, Cooper *et al* ont pu montrer qu'il était possible de réaliser des motifs d'encre chargée en BMP2 sur des disques de peau décellularisée et que ces motifs induisaient une différenciation osseuse dirigée *in vitro* et *in vivo* (Cooper et al., 2010; Smith et al., 2012)(Figure 21).

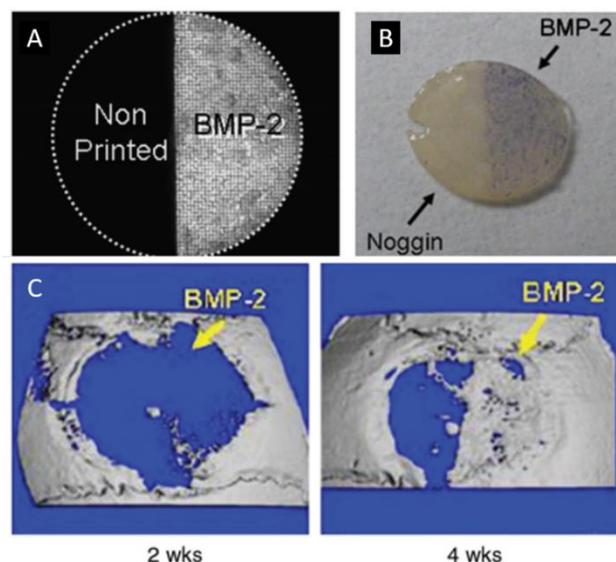


Figure 21: Impression d'encre de BMP2 par technologie inkjet. A) Image fluorescente de Cy5-BMP2 imprimée. B) Mise en évidence de l'activité de la phosphatase alcaline exprimée par les C2C12 après 48H de culture en présence de BMP2 imprimée

et de son inhibiteur Noggin. C) Radiographie à 2 et 4 semaines de la réparation osseuse des disques implantés dans la calvaria de souris.(Cooper et al., 2010)

C'est dans ces années, qu'a débuté au sein de l'Unité INSERM U577 (actuelle U1026 dont je fais partie) les premiers travaux utilisant la technologie d'impression assistée par laser qui consistaient dans un premier temps à imprimer des microgouttelettes chargées en nanoparticules d'hydroxyapatite puis dans un second temps des encres alginate/ EAhy926 et enfin des impressions directement in vivo sur des calvarias de souris (Guillemot et al., 2010; Keriquel et al., 2010)

Au cours des années suivantes, seules les cellules et/ou les facteurs d'induction ou encore l'hydrogel servant de vecteur d'impression ont réellement changé mais les principes de bases sont restés les mêmes. Quelle que soit la méthode d'impression utilisée, c'est deux approches présentent une caractéristique commune qui consiste à mêler encre cellulaire et "scaffold" dans une solution imprimable unique.

Si d'un point de vue biologique, ces biomatériaux présentaient des résultats positifs sur la différenciation ostéoblastique, il n'en est pas de même pour les caractéristiques mécaniques (Tableau 2). Il en ressort que l'os résiste à des contraintes mécaniques 1000 fois supérieures à celles que peuvent supporter les bioencres.

Tissus ou matériaux	Force de Compression	Références bibliographiques
Os trabéculaire mandibulaire	3,9±2,7 MPa	(Misch et al., 1999)
Os cortical fémoral	120-140 MPa	(Havaldar et al., 2014)
Ciments CPC	10-100 MPa	(Mellier, 2011; Zhang et al., 2012)
Gelatine méthacrylée 10%	25 kPa	(Wang et al., 2017)
Gelatine 20% /Alginate7,5%	27-37 kPa	(Zhang et al., 2013)
Chitosan / fibres de soie	4-6 kPa	(Zhang et al., 2019)

Tableau 2: Comparatif des valeurs de forces de compression nécessaire à la destruction d'un tissu ou d'un matériau.

Pour se rapprocher des besoins mécaniques de l'os tout en préservant le microenvironnement biologique et mécanique des cellules, il est envisageable de combiner les différentes technologies d'impression 3D. Pour cela, des sociétés comme RegenHU, proposent des modèles d'imprimantes multi-têtes combinant à la fois les technologies ink jet, extrusion, FDM... (Figure 22). Ainsi, ces imprimantes peuvent imprimer simultanément une solution inerte à forte viscosité pour créer un scaffold avec les propriétés mécaniques se rapprochant du tissu osseux et des solutions à faibles viscosités aux propriétés biologiques adéquates pour les cellules.



Figure 22: Imprimante 3D Discovery de RegenHU équipée de 4 têtes d'impression. (Source : <https://www.aniwaa.fr/produit/imprimantes-3d/regenhu-3ddiscovery/>)

A ce jour, peu d'études dans le domaine de l'ingénierie osseuse exploitent cet axe technologique qui pourrait répondre à certaines problématiques observées depuis des années. Les raisons qui expliquent ce manque de données sont dues au fait que ces machines sont très onéreuses et que les matériaux avec de bonnes propriétés mécaniques permettant une co-impression avec une encre cellulaire sont quasi inexistantes.

Afin de pallier au manque de matériaux disponibles, les recherches se sont orientées vers la modification des hydrogels déjà existants afin d'augmenter leurs propriétés mécaniques et de les utiliser comme scaffold.

Une de ces stratégies consiste à l'ajout de nanoparticules d'argile à un hydrogel. Elles permettent d'augmenter la viscosité des hydrogels et de se solidifier après impression. Elles peuvent être associées soit à du polyéthylène glycol diacrylate (PEGDA) (Zhai et al., 2018), soit du GelMA (Cidonio et al., 2019) mais aussi à d'autres hydrogels photopolymérisables.

La méthode la plus évidente est d'ajouter un phosphate de calcium naturellement présent dans l'os à un hydrogel. C'est ce que propose Kuss *et al* dans leur étude où ils ont co-imprimé un scaffold composé d'HA/PCL avec une bioencre constituée d'acide hyaluronique et de gélatine méthacrylées mélangée avec de la SVF (stromal vascular fraction)(Kuss et al., 2017).

Une autre stratégie consiste à utiliser l'impression coaxiale pour imprimer un CaP entouré d'une encre cellulaire alginate/MC3T3 (Raja and Yun, 2016). Ce système utilise une seule tête d'impression connectée à deux réservoirs : un pour la solution de CaP et l'autre contenant la bioencre (Figure 23).

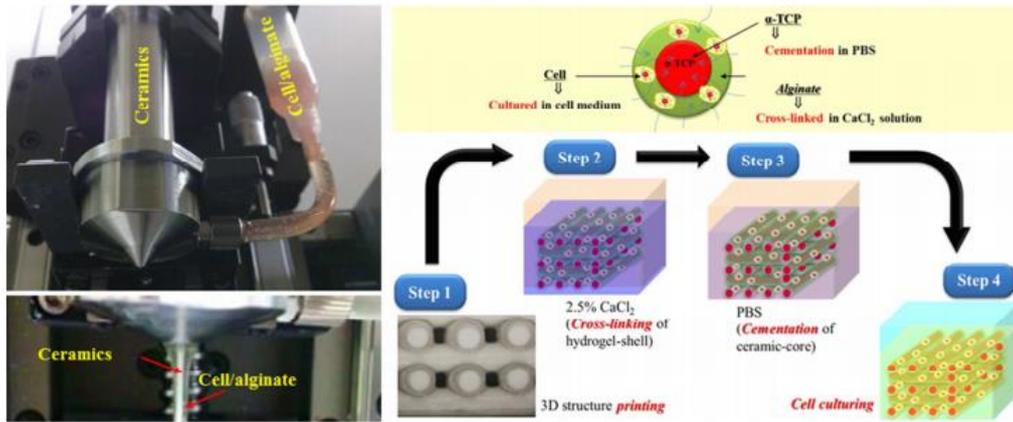


Figure 23: Illustration de la méthode d'impression coaxiale par Raja Naren et Yun Hui-Suka

Une des équipes ayant le plus avancé dans le domaine est celle de Michael Gelinsky en Allemagne qui a développé le ciment phosphocalcique CPC commercialisé par la société Innotere™. Grâce à cette pâte utilisable en micro-extrusion et à une imprimante multi-têtes, ils ont réussi à co-imprimer simultanément un scaffold de CPC et une bio-encre composée d'alginate et de hTERT-MSCs (Ahlfeld et al., 2018) (Figure 24A).

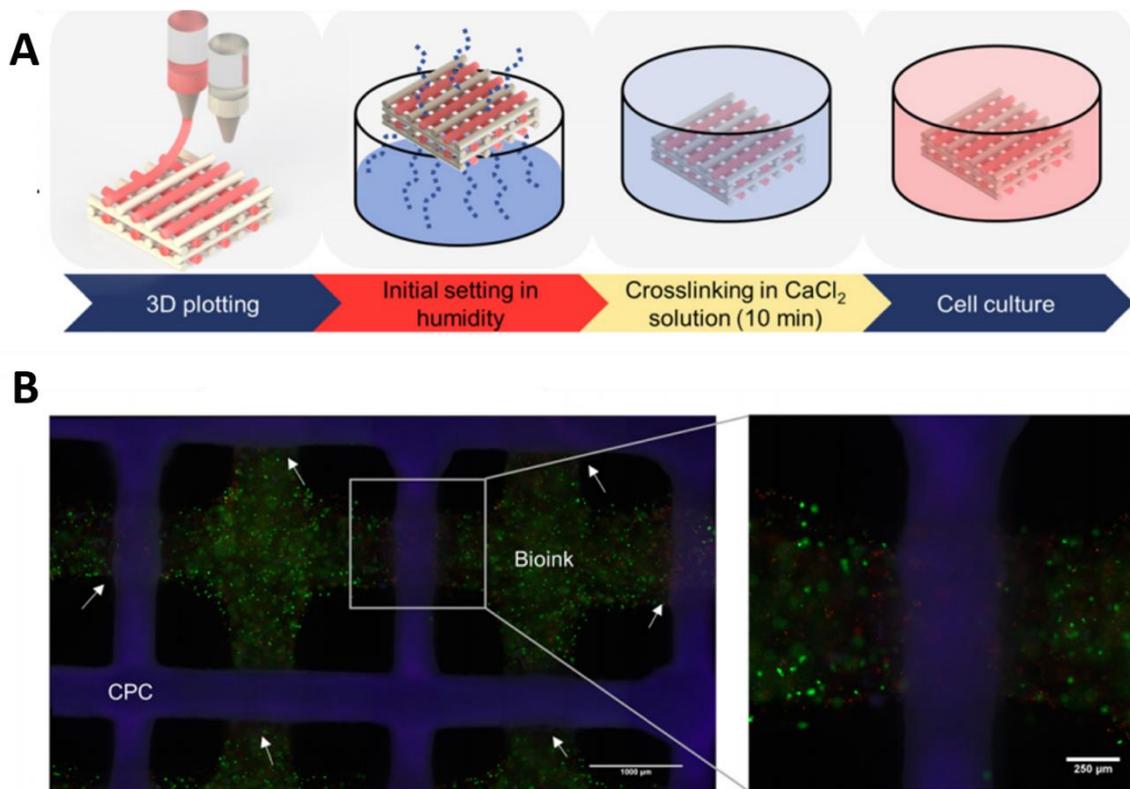


Figure 24: Schéma de la méthode employée par Ahlfeld et al pour co-imprimer la pâte CPC et l'encre cellulaire Alginate/hTERT-MSCs. A) Etape 1 : Les deux matériaux sont imprimés simultanément. Etape 2 : Phase de solidification du ciment CPC en atmosphère humide. Etape 3 : Réticulation de l'alginate dans du  $\text{CaCl}_2$ . Etape 4 : Maturation de la construction dans du milieu de culture. B) Test de viabilité réalisé sur l'encre cellulaire co-imprimée avec le ciment CPC.

Les résultats de cette étude montrent que la construction d'un biomatériau biphasique était possible. Cette construction a un module de compression d'environ 40 MPa et les cellules sont capables de

migrer et de coloniser le matériau scaffold au bout de 21 jours. Cependant, les images du test de viabilité dans les jours précoces montrent une toxicité localisée aux intersections entre le CPC et l'encre cellulaire (Figure 24B).

#### 4.3.L'INNOTERE CPC-Paste matériau de référence : intérêt et limites

Comme mentionné dans la partie 4.2.2, les matériaux commerciaux disponibles pour fabriquer un scaffold avec des propriétés mécaniques suffisantes sont peu nombreux. A notre connaissance, seul le ciment phosphocalcique Innotere (Plotter-Paste-CPC) est disponible actuellement sur le marché. En réalisant une étude bibliographique sur ce produit nous avons pu en déterminer la composition (Lode et al., 2014) (Tableau 3).

<b>Partie minérale : 80% du produit final</b>	
<b>Composants</b>	<b>Quantité</b>
α-Tricalcium phosphate	60%
Dicalcium phosphate anhydre	26%
Carbonate de Calcium	10%
Hydroxyapatite	4%
<b>Vecteur liquide : 20% du produit final</b>	
<b>Composants</b>	<b>Quantité</b>
Miglyol 812	75%
Tween 80	15%
Amphisol A	10%

Tableau 3: Composition du ciment CPC Innotere d'après Lode et al 2014.

Ce ciment développé pour l'impression 3D a la caractéristique d'être extrudable et de se solidifier au contact d'un milieu aqueux ou d'une atmosphère humide. Cette caractéristique est très intéressante car la solidification du matériau peut se faire dans un milieu de culture cellulaire, ce qui laisse entrevoir la possibilité de co-impression cellulaire avec ce ciment. L'autre point intéressant de ce produit est la composition du vecteur liquide de la pâte. Il permet à la fois de maintenir la viscosité de la pâte avant l'extrusion mais évite aussi le contact de l'humidité avec les poudres, empêchant ainsi la réaction de prise en masse dans la seringue et permettant donc sa conservation. Néanmoins comme beaucoup de ciments aqueux, il présente une acidification localisée au moment de la prise en masse, pouvant être toxique pour les cellules et une faible macroporosité.(Yousefi, 2019). De plus, la solidification en milieu aqueux de ce ciment engendre des microfissures ce qui pourraient être dommageables pour l'intégrité de la structure en présence de contraintes mécaniques post-implantation. Le dernier inconvénient de ce produit est son conditionnement. Ce ciment est vendu stérilisé dans des seringues spécifiquement adaptées à l'imprimante de RegenHU.

Pour envisager un futur déploiement de la bio-impression en chirurgie dentaire et en chirurgie orthopédique il est donc nécessaire de développer de nouveaux matériaux imprimables afin de proposer des choix de matériaux les plus adaptés aux sites d'implantations mais aussi aux différentes imprimantes disponibles.

## 5.Objectifs scientifiques de l'étude

Les limites dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et particulièrement celui du tissu osseux concernent le développement de substituts osseux qui soient à la fois ostéo-inducteurs, ostéo-conducteurs, biocompatibles, cellulairement organisés, vascularisés et ayant des propriétés

mécaniques proches de celle du site d'implantation. La plupart des matériaux utilisés ces dernières années dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse ne répondent que partiellement à ces besoins. En effet, qu'ils soient synthétiques ou naturels, ces biomatériaux présentent tous des lacunes dans le domaine de l'organisation des cellules au sein du matériau et leur conception qu'elle soit sous forme de blocs, de granules ou de pâtes ne favorise pas ou peu le développement d'une néo-vascularisation.

Grâce au développement technologique dans le domaine médical, notamment de l'impression 3D, de nouveaux concepts d'étude sont apparus. Les techniques de bio-impression et le développement des bio-encre, nous permettent d'envisager la fabrication de tissus complexes au niveau de leur forme et de l'organisation cellulaire interne. Cependant, l'impression 3D dans le domaine de l'ingénierie osseuse s'est souvent limitée au développement de substituts osseux acellulaires, privilégiant plutôt le rôle mécanique du tissu à celui du biologique.

Néanmoins, depuis une dizaine d'années, les équipes de recherche utilisant l'impression 3D se sont intéressées au développement de biomatériaux permettant un compromis entre les performances mécaniques spécifiques au tissu osseux et l'organisation cellulaire qui joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie tissulaire. Cette double contrainte spécifique au tissu osseux, reste une problématique importante dans le domaine de la médecine régénératrice.

L'impression 3D des cellules nécessite l'utilisation d'encres de faible viscosité permettant de préserver la viabilité cellulaire lors de l'impression. Cependant, ces encres bioactives ne sont pas satisfaisantes d'un point de vue mécanique. A contrario, les encres de fortes viscosités présentent des caractéristiques mécaniques intéressantes mais ne permettent pas, à notre connaissance, d'imprimer des cellules vivantes.

Afin de répondre à cette problématique par les techniques de bio-impression, il est nécessaire de d'envisager la co-impression. En effet, l'impression d'une seule solution très visqueuse contenant des cellules permettant la construction d'un scaffold cellulièrement hiérarchisé semble impossible. Il est donc préférable d'envisager l'impression en parallèle d'une part d'un matériau structurant échafaudage (scaffold) qui apportera la forme et les propriétés mécaniques au biomatériau, et d'autre part l'impression des cellules avec une encre séparée pour apporter le contingent ostéogénique au matériau composite.

Malheureusement, si l'utilisation et le choix des encres cellulaires sont assez bien décrites dans la littérature scientifique, les matériaux co-imprimables disponibles pour le scaffold ne sont pas très nombreux et quasiment inexistant dans le commerce.

C'est dans ce cadre-là que nous avons décidé de développer ce sujet d'étude qui a pour objectif principal de démontrer la faisabilité de la co-impression d'un scaffold phosphocalcique et d'une encre cellulaire pour la création d'un modèle de substitut osseux. Face au manque de matériaux phosphocalciques disponibles en impression 3D, notre objectif secondaire a été de développer un matériau scaffold utilisable en micro-extrusion.

Pour la réalisation de ce projet, nous avons bénéficié d'une part des compétences de l'Unité INSERM U1026 BIOTIS (Bioingénierie Tissulaire) à laquelle j'appartiens en tant qu'Assistant Ingénieur, et de l'Accélérateur de Recherche Technologique (ART BioPrint) créé en 2017 au sein de l'unité Biotis de Bordeaux pour la bioimpression 3D.

Pour le développement et la caractérisation du matériau phosphocalcique, nous nous sommes appuyés sur une recherche bibliographique importante et sur les compétences techniques d'un

chimiste de l'Unité INSERM U1026. Nous avons aussi sollicité les conseils de l'équipe du CIRIMAT de Toulouse et plus particulièrement l'équipe de Christèle Combes dont l'expertise sur les ciments phosphocalcique est reconnue et avec qui nous collaborons depuis plus de 10 ans. La première partie du rapport concerne le développement et la caractérisation du matériau, la seconde partie est consacrée à la mise au point de l'impression du matériau et enfin la troisième partie s'intéresse à la co-impression matériaux/cellules.

### 5.1. Objectif 1 : Développement et caractérisation du matériau phosphocalcique imprimable.

Notre objectif initial a été de développer un ciment phosphocalcique semblable à celui produit par Innotere car il valide déjà beaucoup de points attendus dans le cahier des charges d'un matériau imprimable et les premières implantations en site osseux chez le rat que nous avons réalisé au sein du laboratoire sont très encourageantes (Fenelon et al., 2021). Cependant le développement d'un tel produit est long, coûteux et nécessite des appareils spécifiques pour la synthèse des différents précurseurs. De plus, ce matériau n'est pas parfait car nous avons pu observer que sa conservation dans sa seringue de conditionnement avait un temps limité, que le temps nécessaire à sa prise totale du ciment en milieu aqueux était de plusieurs jours et qu'il présente des phénomènes toxiques au contact direct avec les cellules. Nous avons donc choisi de développer un matériau plus simple et peu coûteux sur la base de nos recherches bibliographiques.

Dans le laboratoire nous avons déjà expérimenté la fabrication d'hydrogels d'alginate chargés en particules d'hydroxyapatite. Cependant les expériences d'extrusion menées précédemment n'ont pas été concluantes du fait d'un manque d'homogénéité de la solution. En effet, au moment de l'extrusion, la phase aqueuse était expulsée dans un premier temps, les grains d'hydroxyapatite s'aggloméraient dans la seringue, ce qui empêchait l'obtention d'un extrudât homogène.

Nous avons trouvé un protocole de synthèse d'hydroxyapatite dans de la gélatine méthacrylée pour une application en ingénierie osseuse (Zuo et al., 2015). Dans cette étude, les auteurs ont développé des blocs de GelMA-HA cellularisables et empilables afin d'obtenir un modèle d'ostéon (Figure 25).

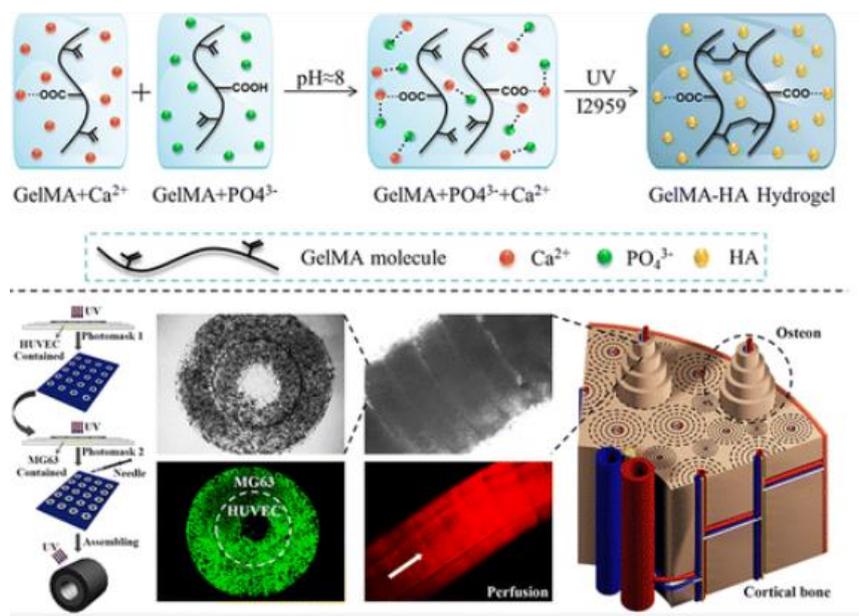


Figure 25: Schéma explicatif du principe de synthèse de l'hydroxyapatite dans la gélatine méthacrylée employée par Zuo et al.

Cette méthode de synthèse a servi de base dans notre projet car ce biomatériau présente plusieurs avantages :

- 1) La solution contient des phosphates de calcium répartis de façon homogène dans la solution, ce qui évite l'obstruction de la seringue d'extrusion
- 2) Il est possible de solidifier ce matériau par photopolymérisation, ce qui est très intéressant car notre imprimante 3D est équipée d'une lampe UV adaptée
- 3) Tous les éléments pour synthétiser cette GelMA-HA sont peu coûteux, ils ne nécessitent pas d'équipement spécifique pour la synthèse et ils sont disponibles dans notre laboratoire. La principale limite de ce matériau pour l'impression 3D est la propriété thermosensible de la GelMA avant sa photopolymérisation. Afin d'obtenir une viscosité adaptée à l'impression, il fallait avoir une température comprise entre 25 et 30°C. En dessous de 25°C la gélatine reste solide et au-dessus de 30°C la solution est trop liquide et ne permet pas une impression régulière.

Cependant, l'impression n'a pas pu être réalisée avec cette solution car la viscosité était trop faible.

Nous avons donc comparé plusieurs concentrations de GelMA-d'HA afin d'adapter ce matériau à l'impression mais là encore les résultats ont été insatisfaisants. A faible concentration le matériau n'était pas assez visqueux et il s'étalait sur le support avant de pouvoir être polymérisé. A forte concentration, la solution polymérisait trop rapidement, rendant l'impression impossible.

Par la suite, les travaux de Schuurman *et al* nous ont permis d'améliorer l'imprimabilité de notre matériau grâce notamment à l'adjonction d'acide hyaluronique. Dans leur étude, Schuurman et son équipe se sont intéressés au développement d'une matrice composite GelMA/acide hyaluronique pour imprimer un scaffold utilisable en ingénierie du tissu cartilagineux.(Schuurman et al., 2013)

Nous avons donc testé plusieurs concentrations de GelMA-HA/ Ac Hyaluronique afin d'optimiser l'imprimabilité du matériau. La composition GelMA-10% HA-4% Ac hyaluronique-1,25% était la plus adaptée en termes de viscosité au moment de l'impression et de stabilité avant la polymérisation. Nous avons donc pu mener les études de caractérisation physico-chimiques, biologiques de ce matériau ainsi que des tests d'imprimabilité.

## 5.2. Objectif 2 : Caractériser l'imprimabilité du matériau

L'évaluation de l'imprimabilité d'un matériau est un critère très important dans le domaine de l'impression 3D et de la bio-impression car elle permet de déterminer les conditions idéales d'impression liées à la machine pour un matériau donné. Cependant, la grande variabilité des imprimantes, ainsi que des techniques d'impression et de l'application finale de l'élément construit ne permettent pas actuellement d'avoir un référentiel normé pour caractériser l'imprimabilité d'un matériau ou d'une encre. Afin d'évaluer la pertinence des mises au point réalisées sur nos conditions d'impression et avoir un regard objectif sur la qualité nos éléments imprimés, nous nous sommes référés aux travaux de O'Connell *et al* sur la caractérisation des bio-encres utilisées en bio-impression par extrusion et ceux de Gao *et al* réalisés sur l'impression de scaffold GelMA/nano-Argile. Dans leurs travaux, les auteurs ont fait une synthèse sur les caractérisations nécessaires à considérer pour une bonne impression. Ces caractérisations sont réalisées à l'aide de techniques d'imagerie et d'analyses en rhéométrie.(Gao et al., 2019; O'Connell et al., 2020)

Dans le cas de notre étude, nous avons travaillé en parallèle sur la formulation du matériau et sur l'optimisation des conditions d'impression de la GelMA10% + A.Hya1,25% + HA4%. En effet, le choix

final des concentrations de GelMA à 10% et d'A. hyaluronique à 1.25% a été orienté par les recherches bibliographiques mais aussi par les tests d'impression réalisés en parallèle.

Comme la plupart des études ayant recours à l'impression 3D, nous nous sommes focalisés sur la recherche des conditions expérimentales les plus favorables à l'impression d'un motif ayant une bonne résolution, dans un temps réduit.

### 5.3.Objectif 3 : Evaluation biologique de la co-impression

Lors de l'écriture de ce projet en 2018, la co-impression d'un matériau phosphocalcique et d'une encre cellulaire à l'aide d'un système avec deux 2 têtes d'impression sur la même machine n'était pas développée à notre connaissance. En effet, la possibilité de construire couche par couche une structure qui soit à fois rigide et cellulièrement organisée est une véritable avancée dans le domaine de la bioingénierie du tissu osseux qui utilise habituellement des matériaux préformés qui sont ensuite cellularisés. Un mois après le dépôt du projet à l'EPHE, Ahlfeld et al publiaient dans le journal Biofabrication un article avec ce même concept en utilisant la pâte CPC d'Innotere et une encre d'Alginate contenant des MSCs immortalisées. La publication de cet article nous a conforté dans l'idée que le développement de la co-impression pour une application osseuse était envisageable et optimisable. En effet, dans cet article, les auteurs ont réussi à co-imprimer le matériau phosphocalcique et l'encre cellulaire mais les résultats de l'étude biologique étaient limités à un test de viabilité et à une image de colonisation cellulaire du matériau à 21 jours, ne permettant pas de conclure sur un potentiel effet ostéo-inducteur du CPC sur les cellules *in vitro*.

**Ainsi les objectifs que nous nous sommes fixés** étaient de pouvoir réaliser une co-impression simultanée d'une encre cellulaire avec le matériau que nous avons développé. Nous voulions évaluer la viabilité cellulaire post-impression avec un test Live Dead et déterminer un potentiel effet ostéo-inducteur de notre matériau avec une mise en évidence de la phosphatase alcaline produite par les cellules lors du processus de différenciation.

Pour ce faire, nous avons choisi de co-imprimer notre matériau phosphocalcique avec une encre d'alginate/acide hyaluronique associée à des cellules MG63. Nous avons choisi ce type cellulaire pour plusieurs raisons :

- Les MG63 sont des cellules immortalisées issues d'ostéosarcome humain et sont donc proches du modèle osseux.
- Leur amplification est rapide et ne nécessite pas de milieux de culture spécifique. C'est important car l'impression d'encres cellulaires requiert plusieurs millions de cellules par mL d'encre.
- Les conditions d'impression nécessitant beaucoup de mises au point, il serait très coûteux de les réaliser avec des cultures primaires utilisant des hBMSCs par exemple.

Le choix du vecteur alginate/acide hyaluronique a été guidé par une étude bibliographique et le matériel à disposition dans le laboratoire. Les encres composées d'alginate sont développées depuis les débuts de la bioimpression et sont bien décrites dans la littérature. Cela nous a permis de nous concentrer sur le développement de matériau phosphocalcique et sa caractérisation. De plus, notre matériau phosphocalcique étant sensible aux variations de températures, nous voulions une encre cellulaire facile à imprimer et physiquement stable pour faciliter le contrôle des paramètres des deux solutions durant la co-impression.

---

## II-Matériels et Méthodes

---

### 6. Techniques de caractérisation physico-chimiques

La caractérisation physico-chimique d'un matériau composite nécessite l'utilisation de plusieurs méthodes en fonction de la nature même des éléments qui le compose. Dans notre cas, le matériau était composé d'une phase organique (GelMA et acide hyaluronique) et d'une phase minérale (hydroxyapatite).

Les différents matériaux comparés dans notre étude avaient la composition suivante :

- Matériau Test : GelMA 10% + Acide Hyaluronique 1,25% + Hydroxyapatite 4% + LAP 0,5% (GelMA+A.Hya+HA)
- Matériau témoin : GelMA 10% + Acide Hyaluronique 1,25% + LAP 0,5% (GelMA+A.Hya)

Le LAP (Lithium Phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate) est un photo initiateur qui initie la réaction de polymérisation en présence de lumière UV.

Dans un 1<sup>er</sup> temps, nous avons caractérisé, le degré de méthacrylation de la GelMA synthétisée par dosage TNBS.

Le protocole de synthèse de la gélatine métacrylée est détaillé en annexe (Annexe 1).

Dans un 2<sup>nd</sup> temps des tests de rhéologie, de swelling ratio, des observations MEB ainsi que des tests de dégradation hydrolytique ont été menés sur le matériau test et sur le matériau témoin afin de caractériser la partie organique du matériau. La partie minérale a été caractérisée par analyse thermogravimétrique, par diffraction des rayons X et par MEB.

Enfin, des études de cytocompatibilité du matériau ont été réalisées avec des cellules MG63. Nous avons étudié leur effet sur la viabilité cellulaire en utilisant le test du Live/Dead et l'évaluation de la cytotoxicité de ces matériaux a été réalisée par les tests MTT et RN.

#### 6.1. Détermination du taux de méthacrylation de la gélatine : TNBS Assay

Principe :

Le TNBS (Trinitrobenzene Sulfonic Acid) est un réactif utilisé pour le dosage des groupements amines libres des protéines (Habeb, 1966). Les amines primaires réagissent avec le TNBS pour former un composé dosable par spectrométrie à 355nm (Figure 26). Ce dosage permet de déterminer de façon indirecte le taux de méthacrylation.

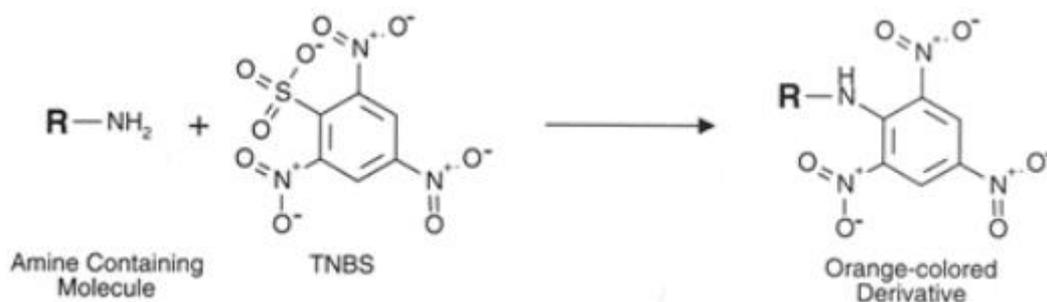


Figure 26: Schéma de la réaction entre une amine primaire libre et le TNBS pour former un dérivé coloré mesurable par spectrophotométrie. Source : TNBSA Products instructions. Ref : TS28997 Thermo Scientific.

### Protocole :

- Préparer une solution tampon de bicarbonate de soude ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ , Sigma-Aldrich) à 0,1M et à pH=8,5.
- Dissoudre à 60°C pendant 1h et sous agitation la gélatine méthacrylée lyophilisée à 1 mg/mL dans la solution de bicarbonate de soude à 0.1M. Répéter la même opération avec la gélatine lyophilisée ayant servi à la synthèse de la GelMA.
- Diluer le TNBS 5% dans le tampon bicarbonate de soude au 1/500.
  
- Préparation des échantillons : 500µL d'échantillon +250µL de TNBS dilué au 1/500.
- Préparation des blancs de lecture : 500µL de bicarbonate de soude à 0,1M + 250µL de TNBS dilué au 1/500.
- Laisser incuber 2h à 37°C en agitant régulièrement
- Ajouter 250µL de SDS 10% par échantillon et dans les blancs.
- Ajouter 125µL de HCL 1M par échantillon et dans les blancs.
- Agiter les échantillons et les blancs.
- Lire l'absorbance des solutions à 335 nm.

La détermination de la quantité d'amines libres et le degré de méthacrylation sont donnés par les formules suivantes :

$$\text{Pourcentage d'amines libres} = \frac{\text{Absorbance de GelMA} - \text{Absorbance moyenne des blancs}}{\text{Absorbance de Gelatine} - \text{Absorbance moyenne des blancs}} \times 100 \text{ en } \%$$

$$\text{Degré de méthacrylation} = 100\% - \% \text{d'amine libres en } \%$$

### 6.2.Fabrication du matériau composite imprimable : GelMA10%/A.Hya1,25%/HA4%

#### Principe :

Comme présenté dans la partie 5-2, la conception de ce matériau repose sur le principe de synthèse développé par Zuo *et al* 2015 et les travaux de Schuurman *et al* 2013. Brièvement, les parties aqueuses des solutions de calcium et de phosphate sont remplacées par de la gélatine afin d'obtenir une solution finale avec une concentration en gélatine méthacrylée de 10% et une concentration d'hydroxyapatite de 4% avec un rapport Ca/P= de 1,67. Une fois la GelMA-HA synthétisée, l'acide hyaluronique et le LAP sont ajoutés pour améliorer les propriétés de viscosité et conférer la propriété de photopolymérisation.

#### Protocole :

Pour 10mL de GelMA 10%/A.Hya 1,25%/HA 4% :

- Préparation de la solution GelMA-Calcium : Dissoudre 0,5g de GelMA dans 5 mL de  $\text{CaCl}_2$  à 88,3 g/mL sous agitation à 50°C jusqu'à dissolution complète. ( $\text{CaCl}_2$  anhydre, Sigma-Aldrich)
- Préparation de la solution GelMA-Phosphate : Dissoudre 0,5g de GelMA dans 5mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 67,8 mg/mL sous agitation à 50°C jusqu'à dissolution complète. ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydre, Acros Organics)
- Verser goutte à goutte la GelMA-P dans la GelMA-C sous agitation à 37°C et ajuster le pH de la solution à 8. Laisser 24H sous agitation à 37°C.
- Dissoudre 125mg d'acide hyaluronique dans la solution de GelMA-HA 3H à 37°C sous agitation.
- Ajouter 250µL de LAP à 200 mg/mL. Agitation au vortex
- Garder la solution dans l'obscurité jusqu'à utilisation.

### 6.3. Evaluation des propriétés viscoélastiques du matériau par rhéologie.

#### Principe :

La rhéologie est une méthode permettant d'évaluer les rapports entre la viscosité, la plasticité et l'élasticité de la matière, ainsi que le comportement de celle-ci sous l'influence des pressions. Pour cela, un échantillon circulaire de diamètre identique au stator est placé dans le rhéomètre. Un rotor vient se fixer au contact du matériau et exerce une rotation sur le matériau (contraintes de cisaillement) (Figure 27). Le module viscoélastique  $G'$  (en Pa) du matériau est enregistré en temps réel et est exprimé en fonction de la fréquence d'oscillation appliquée.

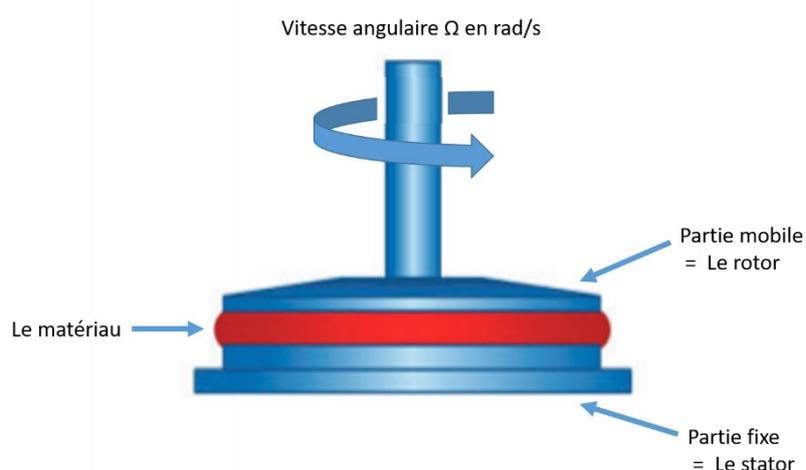


Figure 27: Schéma du principe de fonctionnement d'un rhéomètre à plateaux parallèles. Adapté d'après : « De meilleurs résultats rhéologiques : créer des SOP qui génèrent des mesures rhéologiques efficaces » Küchenmeister et al. Thermoscientific.

#### Protocole :

- Dans un moule en PMMA de 1,8 cm de diamètre, couler 500 $\mu$ L de GelMA+A.Hya+HA avec 0.5% de LAP (Phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate. TCI Europe) chauffée à 50°C. Répéter la même opération avec le matériau témoin GelMA+A.Hya.
- Polymériser sous une lampe UV à 365nm durant 60 secondes.
- Démouler les échantillons et les conserver dans du PBS 1X
- Placer l'échantillon dans le rhéomètre (Kinexus Pro, Malvern Instruments)
- Effectuer un balayage de fréquences à une déformation de 0.15% dans une gamme de fréquences angulaires de 0,1-100 rad/s.

### 6.4. Test de gonflement du matériau : Swelling test

#### Principe :

Le test de gonflement ou swelling test est une méthode de caractérisation permettant de déterminer le taux de gonflement d'un hydrogel plongé dans un milieu aqueux. Généralement, le matériau est totalement déshydraté, pesé puis il est plongé dans de l'eau ou du PBS à 37°C. A différents temps, l'hydrogel est pesé afin de déterminer le taux de gonflement : swelling ratio dont la formule est la suivante.

$$\text{Swelling Ratio} = \frac{W_t - W_d}{W_d} \times 100 \%$$

Où  $W_t$  et  $W_d$  sont respectivement le poids du matériau réhydraté au temps  $t$  et le poids du matériau déshydraté au temps  $t_0$ . Cette formule est applicable pour les hydrogels qui se réhydratent spontanément à 37°C après une déshydratation.

Dans le cas de notre matériau, nous avons adapté ce protocole car la gélatine méthacrylée photopolymérisée puis lyophilisée se réhydratait très mal à 37°C. De plus, l'information qui nous intéresse n'est pas le gonflement maximum que peut subir le matériau déshydraté un fois plongé dans une solution aqueuse, mais son gonflement possible post-impression.

Afin d'adapter au mieux ce test à notre type de matériau, nous avons donc déterminé le gonflement post polymérisation en appliquant la formule suivante.

$$\text{Swelling Ratio} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \%$$

Où  $W_t$  et  $W_0$  sont respectivement le poids du matériau au temps  $t$  et le poids du matériau au temps  $t_0$  post-polymérisation.

Ces données seront importantes pour nous car le gonflement du matériau va directement influencer l'architecture finale de la construction imprimée et notamment la porosité.

#### Protocole :

- Couler dans des moules en PDMS de 1.8 cm de diamètre 700µL de matériau (matériaux tests et matériaux contrôles). N=3 matériaux par conditions.
- Réticuler sous la lampe UV 1min à 365nm.
- Peser les matériaux.
- Placer les matériaux dans du PBS 1X à 37°C
- A chaque time point : Sortir les matériaux du PBS. Disposer les sur du papier filtre dans des colonnes de filtration. Faire le vide pendant 10 sec pour éliminer l'excédent de liquide.
- Peser les matériaux.
- Remettre les matériaux dans le PBS 1X à 37°C jusqu'au prochain time point.

### 6.5. Test de dégradation hydrolytique

#### Principe :

Les bio-polymères comme la gélatine et l'acide hyaluronique sont soumis à des phénomènes de vieillissement qui peuvent être liés à des phénomènes physiques comme des rayonnements ionisants, ou bien chimiques comme une dégradation oxydative ou une dégradation hydrolytique.

Le principe ici est d'évaluer si le milieu aqueux dégrade spontanément notre matériau au cours du temps ce qui pourrait compromettre la solidité de notre construction post impression. Pour cela, nous avons suivi et adapté le protocole du test de dégradation hydrolytique in vitro pour des résines polymères utilisées pour les implants chirurgicaux (norme ASTM F1635-11).

#### Protocole :

- Couler dans des moules en PDMS de 1,8 cm de diamètre 400µL de matériau. N=3 matériaux par conditions et par time point.
- Polymériser aux UV 1min à 365 nm.

- Mettre les matériaux dans du PBS 1X azide 0,1% à 37°C.
- A chaque temps, sortir les matériaux du PBS et placer les à l'étuve 24h à 37°C
- Peser les matériaux.

La moyenne des poids des matériaux a été reportée sur un graphique en fonction du temps.

## 6.6. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

### Principe :

La microscopie électronique à balayage est une technique d'imagerie haute résolution permettant d'observer la surface d'un échantillon préalablement métallisé.

### Protocole :

- Couler 400µL du matériau test dans un moule et photopolymériser aux UV 1min à 365nm
- Répéter l'opération avec le matériau contrôle.
- Lyophiliser les échantillons pendant 24H/48H
- Placer les échantillons dans le métalliseur
- Une fois métallisés, mettre les échantillons dans le MEB et réaliser les acquisitions.

## 6.7. Détermination de la quantité de phase minérale par analyse thermogravimétrique (ATG)

### Principe :

L'Analyse thermogravimétrique est une technique d'analyse thermique qui permet de mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction du temps, pour une température ou un profil de température donné (Figure 28).

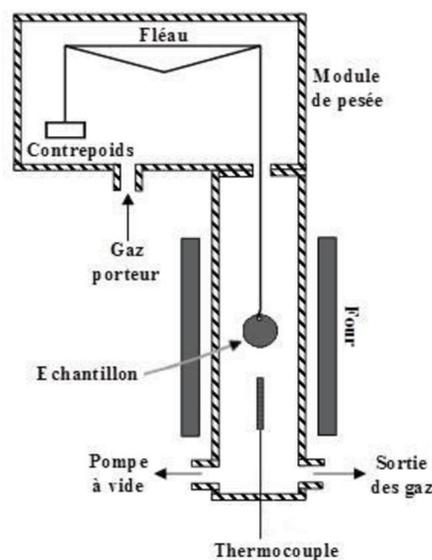


Figure 28: Schéma du principe de fonctionnement d'un ATG. Lors de la montée en température du four, l'échantillon va se calciner et perdre de la masse. La variation de poids en fonction de la température est monitorée dans le module de pesée. Source : Thèse Rolland R 2012.

Durant le processus d'augmentation de la température, l'eau est éliminée vers 100/110°C, puis les éléments organiques sont détruits jusqu'à 600°C environ. Après 600°C, seul les éléments minéraux persistent dans le porte échantillon.

#### Protocole :

- Couler 400µL du matériau test dans un moule et photopolymériser aux UV 1 min à 365 nm
- Répéter l'opération avec le matériau contrôle.
- Lyophiliser les échantillons pendant 24H/48H.
- Broyer les échantillons
- Disposer environ 20mg d'échantillon dans le creuset de l'appareil
- La cinétique de montée en température est la suivante : 10°C/min

La variation du poids de l'échantillon est exprimée en pourcentage de perte de masse en fonction de la température.

### 6.8.Caractérisation de la phase minérale par diffraction des rayons X (DRX)

#### Principe :

La DRX est une technique de caractérisation des matériaux cristallisés, principalement appliquée aux matériaux inorganiques. Les faisceaux de rayons X produits par le tube sont envoyés sur l'échantillon dans lequel ils sont déviés par les atomes. Ces faisceaux diffractés interfèrent entre eux, conduisant à la production d'un signal intense dans certaines zones précises de l'espace. C'est ce signal qui est collecté par le détecteur, et tracé sous forme d'une courbe (diffractogramme) qui présente des pics à des angles bien spécifiques de diffraction. Ces diffractogrammes sont spécifiques à un composé chimique cristallin. Ainsi grâce à un catalogue de diffractogrammes de référence, il est possible de caractériser les divers composants d'un matériau cristallin.

#### Protocole :

- Préparer 1 mL de matériau test et de matériau contrôle et les photo-polymériser aux UV 1 min à 365 nm.
- Lyophiliser les échantillons pendant 24H/48H.
- Broyer les échantillons
- Disposer la poudre sur la surface du porte échantillon de l'appareil.
- L'acquisition est réalisée dans un balayage de 5 à 80° 2-theta avec un incrément de 0.02°

### 7.Caractérisation de l'imprimabilité du matériau phosphocalcique

Pour réaliser l'impression de notre matériau, nous avons utilisé l'imprimante 3D Discovery de RegenHU (Figure 22) avec une tête d'extrusion pneumatique et une tête équipée d'une lampe UV à 365 nm. Le matériau était placé dans une cartouche de 5 mL équipée d'un cône d'extrusion avec un diamètre interne de 250 µm. Les seuls paramètres contrôlés dans cette configuration étaient la distance entre le cône et la surface réceptrice, la vitesse de déplacement de la tête d'impression et la pression d'air permettant l'extrusion. Les conditions ambiantes comme la température et l'hygrométrie étaient moins bien contrôlées et pouvaient être fluctuantes selon la saison car l'imprimante n'est pas placée dans un environnement contrôlé.

Les motifs d'impression ont été réalisés à l'aide du logiciel de CAO BioCAD®.

### 7.1. Impression de lignes :

#### Principe :

La pression et la vitesse de déplacement ont un effet antagoniste sur l'épaisseur de l'extrudât : une forte pression associée à une faible vitesse engendre une impression grossière (Figure 29 A) alors qu'une faible pression associée à une vitesse rapide produit un extrudât discontinu (Figure 29 B). L'impression de simples lignes permet de déterminer les conditions idéales de pression et de vitesse de déplacement de la tête d'impression, de façon à obtenir un extrudât le plus fin et le plus régulier possible (Figure 29 C). L'évaluation de résolution de l'impression de la ligne a été réalisée par la mesure de la largeur de l'extrudât.

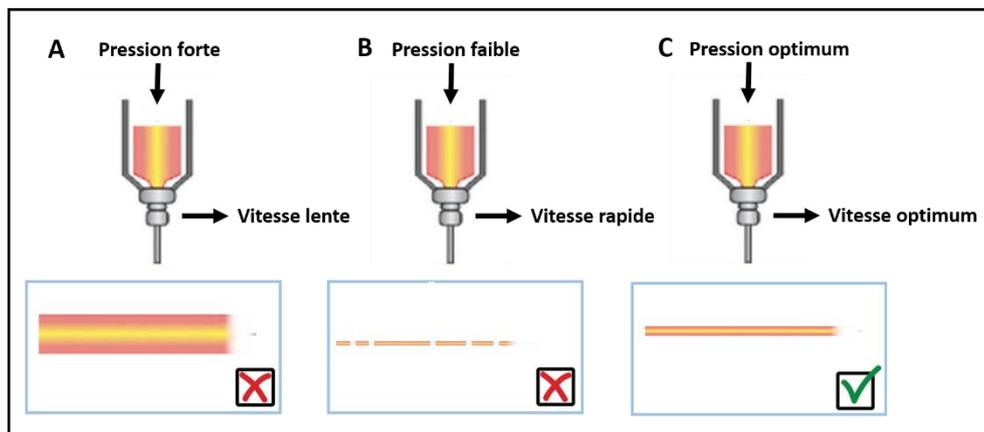


Figure 29: Schéma explicatif du résultat d'impression en fonction de la variation du ratio pression/vitesse de déplacement de la tête d'impression.

#### Protocole :

- Réaliser le pattern d'impression avec le logiciel Biocad (5 lignes d'impression avec des vitesses de déplacement croissantes pour chaque ligne : 125, 150, 175, 200 et 250 mm/s)
- Disposer le matériau pré chauffé à 37°C dans la cartouche d'impression. Laisser refroidir 5/10 min.
- Imprimer sur une lame de verre avec une pression fixe de 0,02MPa, puis de 0,03MPa et enfin de 0,04MPa
- Faire les photos des lignes imprimées à la loupe (Leica MZ10F)
- Traitement d'images et mesure de la largeur des extrudâts sur Image J.

### 7.2. Impression de grilles :

#### Principe :

L'impression de motifs sous forme de grilles est une étape indispensable dans l'évaluation de l'imprimabilité d'un matériau car elle permet d'évaluer la résolution d'impression et la régularité de l'impression.

**La résolution d'impression  $\theta$**  peut-être définie comme le rapport de la surface théorique d'un pore sur la surface réelle du pore post-impression. Contrairement à la conception réalisée par informatique, les conditions d'impression (vitesse/pression) et la nature même du matériau imprimé (viscosité) vont modifier le résultat final de la construction. Ainsi, en fonction du choix du diamètre du cône d'extrusion

et de l'étalement de l'hydrogel lors de l'impression sur le substrat receveur, la surface des pores sera modifiée par rapport à la planification. Nous avons donc caractérisé la fidélité du motif imprimé par rapport au motif conçu sur le logiciel de CAO (Figure 30).

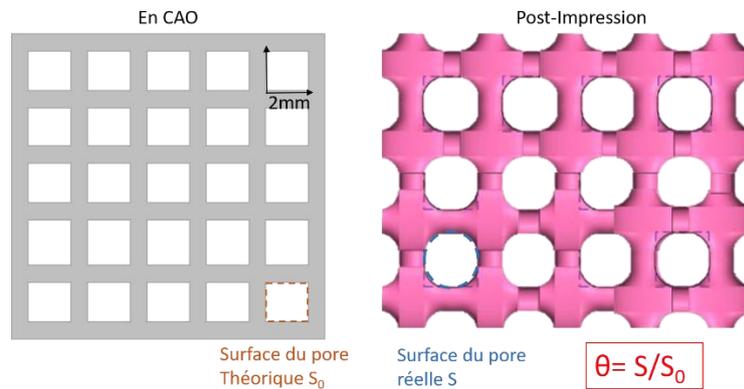


Figure 30: Schéma explicatif de l'évaluation de la résolution d'impression. Adapté de Gao and al 2019

La **régularité d'impression P** est aussi un paramètre important car il permet d'évaluer la qualité de l'encre en terme d'impression (O'Connell et al., 2020). P est défini par la formule suivante :

$$P = \frac{L^2}{16A}$$

Où : P est la régularité d'impression, L le périmètre interne du pore et A l'aire du pore.

Selon la valeur de P, on pourra définir 3 qualités d'impression :

- **Si  $P < 1$**  : le matériau a une viscosité trop faible et il s'étales sur le support. Les pores adoptent alors des contours arrondis (Figure 31 A)
- **Si  $P = 0$**  : Les pores imprimés restent carrés et témoignent d'une bonne imprimabilité du matériau (Figure 31 B).
- **Si  $P > 1$**  : Les pores ont des tailles variables et des bords irréguliers. Cela met en évidence l'impression d'un matériau dont le processus de gélification avait débuté avant l'impression (Figure 31 C).

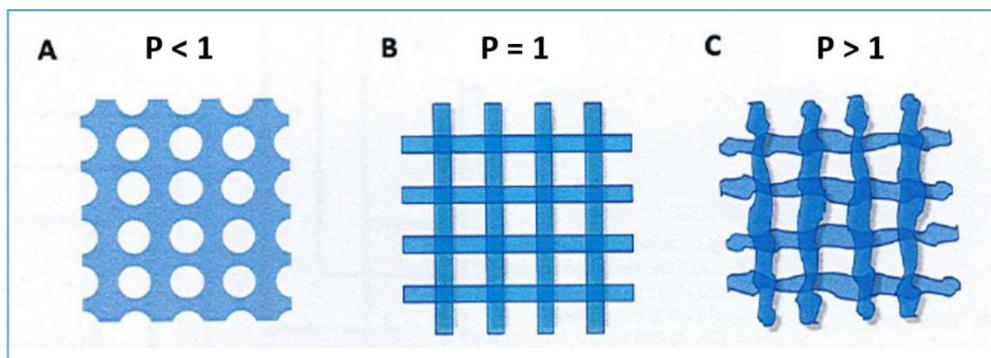


Figure 31: Schéma explicatif de l'imprimabilité d'un hydrogel. A) Résultat obtenu avec un hydrogel faiblement visqueux. B) Résultat obtenu avec un hydrogel avec la bonne viscosité. C) Résultat obtenu avec un hydrogel qui a déjà commencé à se gélifier avant l'impression. Source : O'Connell et al 2020

### Protocole :

- Réaliser le motif d'impression suivant avec le logiciel Biocad : Une grille carrée de 2 cm de côté avec 2 couches d'impression (1ere couche : les lignes horizontales, 2<sup>ème</sup> couche : les lignes verticales).

Espacement entre les lignes	2 mm
Taille des pores	4 mm <sup>2</sup>
Diamètre du cône d'extrusion	250 µm
Vitesse d'impression	125, 175 et 250 mm/sec

- Disposer le matériau pré chauffé à 37°C dans la cartouche d'impression. Laisser refroidir 5/10 min.
- Imprimer sur une lame de verre avec une pression comprise entre 0,04MPa et 0,09MPa
- Faire les photos des grilles imprimées à la loupe (Leica MZ10F)
- Traitement d'images et mesure de l'aire et du périmètre interne des pores sur Image J.

## 8.Caractérisation biologique des matériaux

### 8.1.Préparation de l'encre Alg/AHya-MG63

#### Principe :

Pour la préparation de l'encre cellulaire et le choix du ratio alginate / acide hyaluronique, nous nous sommes inspirés des travaux de (Antich et al., 2020). Dans leur étude, les auteurs réalisaient une impression par extrusion de cellules encapsulées dans une solution d'alginate et d'acide hyaluronique pour le développement d'un modèle de réparation du cartilage. Après avoir testé plusieurs ratios alginate/ hyaluronique, la concentration de 2% alginate/ 1% acide hyaluronique (w/v) a été retenue pour ses qualités d'impression.

#### Protocole de culture des MG63. :

Les MG63 ont été amplifiées à raison de 6000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des flasques de culture de 175cm<sup>2</sup> avec du milieu IMDM (Gibco) supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal (SVF). Le jour de l'impression, elles ont été détachées du support avec de la trypsine EDTA 0,05% (Gibco). Après inactivation de la trypsine, dénombrement et centrifugation, le culot cellulaire a été resuspendu avec l'encre Alg2%/AHya1% à une densité de 10<sup>7</sup> cellules/mL d'encre.

#### Protocole de préparation de l'encre :

La base Alg/AHya de l'encre a été préparée 24h avant l'impression afin d'obtenir une solution homogène. Pour la préparation de 10 mL d'encre :

- 1) Peser 0,2 g d'alginate et 0,1 g d'acide hyaluronique et placer les poudres dans un tube Falcon de 50 mL.
- 2) Mélanger les poudres au vortex.
- 3) Ajouter 10 mL d'eau MilliQ.
- 4) Laisser agiter 24h à 37°C avec un barreau magnétique.

Au moment de la préparation de l'encre cellulaire.

5) Centrifuger la solution d'Alg/AHYa 30 sec à 2500 tr/min pour éliminer les bulles.

6) Avec une pipette à gel, déposer la quantité d'Alg/AHYa sur le culot de MG63 pour obtenir une densité de  $10^7$  cellules/mL.

7) Homogénéiser délicatement l'encre cellulaire à l'aide d'une Micropipette P1000 avec le cône coupé. Il est nécessaire d'agrandir le diamètre du cône afin de limiter les forces de shear stress produites par le pipetage qui pourraient être délétère pour la survie cellulaire.

8) Centrifuger l'encre cellulaire 10 sec à 2500 tr/min pour éliminer les bulles.

9) A l'aide d'une Micropipette P1000 avec le cône coupé, charger délicatement la seringue d'extrusion.

## 8.2. Paramètres et modèle de co-impression

### Principe :

Pour réaliser la co-impression simultanée du matériau phosphocalcique et de l'encre cellulaire nous avons choisi d'utiliser les deux têtes d'extrusion de l'imprimante RegeHU et la lampe à UV. Les différents paramètres d'impression du matériau phosphocalcique sont ceux décrits dans la partie 6.2 : impression des grilles. La mise au point des paramètres d'impression de l'encre cellulaire a été réalisée avant la co-impression mais ne sera pas décrite. Seul les paramètres d'impression choisis de l'encre cellulaires seront décrits dans la section protocole ci-dessous.

### Protocole :

- Réaliser le motif d'impression suivant avec le logiciel Biocad : Une grille carrée de 1,6 cm de côté avec 2 couches d'impression :
  - 1<sup>ère</sup> couche : les lignes horizontales de matériau scaffold, les lignes horizontales d'encre cellulaire, une réticulation aux UVs
  - 2<sup>ème</sup> couche : les lignes verticales de matériau scaffold, les lignes verticales d'encre cellulaire, une réticulation aux UVs.
- Les paramètres d'impression sont les suivants :

	Matériau phosphocalcique	Encre cellulaire
<b>Pression d'extrusion</b>	0,040 MPa	0,008 MPa
<b>Vitesse d'impression</b>	160 mm/sec	200 mm/sec
<b>Diamètre interne du cône d'extrusion</b>	250 $\mu$ m	410 $\mu$ m
<b>Espace entre le cône et la surface receveuse</b>	Détection automatique +50 $\mu$ m	Détection automatique +100 $\mu$ m
<b>Température d'impression de la pièce</b>	25°C	
<b>Espacement entre les lignes</b>	2 mm	
<b>Taille des pores</b>	4 mm <sup>2</sup>	
<b>Concentration cellulaire</b>	X	Test de prolifération : 2,5.10 <sup>6</sup> cellules/mL Test Live dead, ALP et RA : 10,10 <sup>6</sup> cellules/mL

Schémas des impressions en Annexe 3

- Disposer les matériaux pré chauffés à 37°C dans la cartouche d'impression. Laisser refroidir 5/10 min.
- Placer zone d'impression une plaque 6 puits avec des lamelles de verre dans chaque puits.
- Imprimer avec les paramètres ci-dessus.
- Une fois la grille imprimée, ajouter 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM pour réticuler l'alginate et laisser incubé 10 min à 37°C.
- Décanté le CaCl<sub>2</sub> et remplacer par du milieu de culture IMDM 10% SVF 1% pénicilline/streptomycine.
- Faire les photos des grilles imprimées à la loupe (Leica MZ10F) et la caractérisation biologique des structures imprimées

### 8.3. Test de cytotoxicité indirect

#### Principe :

L'évaluation *in vitro* de la cytotoxicité des matériaux a été réalisée par un test MTT/RN à partir d'extraits des matériaux en accord avec la méthodologie de la norme ISO 10993-5. Brièvement, une surface de matériau comprise entre 0,5 et 6cm<sup>2</sup> est mise en contact avec 1 mL de véhicule d'extraction durant 24h. L'extrait a été récupéré puis remplacé par une nouvelle solution de véhicule « fraîche ». Ce processus a été répété 3 fois toutes les 24h pour identifier un éventuel relargage tardif de produits toxiques. Les extraits ont ensuite été mis en contact avec les cellules MG63 pendant 24H. Après ce temps de culture, une coloration MTT a permis d'évaluer l'activité métabolique des cellules. Les sels de tétrazolium du MTT ont été réduits par l'activité mitochondriale des cellules vivantes en cristaux de formazan qui donne une coloration violette dosable par spectrophotométrie.

Parallèlement, une coloration au Rouge Neutre (RN) a été réalisée afin de déterminer le taux de viabilité cellulaire. Les cellules viables sont capables par transport actif de capter le rouge neutre et de le stocker dans leurs lysosomes. Après un lavage et une lyse acide, il était possible de récupérer le colorant et de le doser par spectrophotométrie.

#### Protocole :

- Préparer deux disques de matériaux polymérisés de 1,8 cm de diamètre. Surface total de matériel =  $\pi r^2 \times 4 \text{ faces} = \pi \times 0.9^2 \times 4 = 10.2 \text{ cm}^2$
- Mettre dans un flacon stérile les deux disques avec 3 mL de milieu IMDM + 1% antibiotiques. Rapport surface matériau / véhicule d'extraction = 3,4cm<sup>2</sup>/ mL.
- Après 24h à 37°C, récupérer le véhicule d'extraction. C'est l'extrait 24h (E1)
- Ajouter 3 mL de milieu IMDM + 1% antibiotiques sur les matériaux.
- Après 24h à 37°C, récupérer le véhicule d'extraction. C'est l'extrait 24h (E2)
- Ajouter 3 mL de milieu IMDM + 1% antibiotiques sur les matériaux.
- Après 24h à 37°C, récupérer le véhicule d'extraction. C'est l'extrait 24h (E3)
- Ensemencer des plaques de culture 96 puits avec des cellules MG63 en P38 à une densité de 10000 cellules/cm<sup>2</sup>.
- Une fois arrivé à 80%/90% de confluence cellulaire, retirer le milieu de culture et remplacer le par 200 µL d'extrait de matériau complété avec 10% de sérum de veau foetal (SVF).
- Incuber 24h à 37°C. Retirer le milieu et réaliser les tests MTT/ RN

- Pour le test MTT : Ajouter 150µL de solution de MTT à 0,5 mg/mL dans du milieu IMDM sans rouge de phénol. Incuber 3H à 37°C. Enlever le milieu réactionnel et solubiliser les cristaux de formazan avec 100 µL de DMSO. Lire l'absorbance à 550nm au spectrophotomètre (Victor X3 Perkin Elmer).
- Pour le test RN : Ajouter 150 µL de solution de RN à 40 µg/mL dans du milieu IMDM + 10%SVF. Incuber 3H à 37°C. Enlever le milieu réactionnel et lyser les cellules avec 100µL d'éthanol 50%/acide acétique 1%. Lire l'absorbance à 550nm au spectrophotomètre (Victor X3 Perkin Elmer).

#### 8.4. Test de viabilité Live/Dead (L/D)

##### Principe :

Le test de viabilité Live/Dead repose sur l'utilisation de deux composés : la calcéine AM et l'Ethidium homodimère (EthD-1). La calcéine AM est un composé perméable à la membrane non fluorescent. L'activité de l'estérase dans le cytoplasme de cellules viables convertit la calcéine AM en calcéine composée imperméable à la membrane de couleur vert fluorescent, qui est retenue dans les cellules viables à membranes plasmiques intactes. L'homodimère d'éthidium est un colorant fluorescent rouge imperméable à la membrane qui se lie à l'ADN. Ainsi celui-ci ne pénétrera que les cellules mortes dont l'intégrité membranaire aura été compromise.

##### Evaluation cellulaire avant impression

Le but de cette expérimentation était d'appréhender la viabilité et la mortalité cellulaire dans le cas où les matériaux étaient toxiques par simple contact direct avec les cellules.

- Dans des plaques de culture de 12 puits, déposer à la pipette 50µL de matériau (matériaux test et témoin).
- Photopolymériser aux UV à 365nm durant 1min.
- Ensemencer 30 000 MG63 en P39 par puit avec 2 mL de milieu IMDM + 10% SVF.
- Incuber à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>
- Au bout de 3, 7 et 14 jours de culture, les plaques seront sacrifiées pour réaliser les tests L/D

##### Evaluation cellulaire post impression

Les paramètres d'impression étaient ceux présentés dans le paragraphe 9-2. Pour chaque temps (J7 et J14), des grilles co-imprimées et des grilles d'Alg/AHya-MG63 ont été comparées.

##### Protocole :

- Pour le test Live/Dead :
- Préparer une solution de HBSS 1X avec 4µM d'EthD-1 et 2µM de Calcéine AM. Incuber 15 min à 37°C à l'abri de la lumière.
- Décanter le milieu de culture et rincer la couche cellulaire avec de l'HBSS 1X (Gibco).
- Déposer 250 µL de solution Calcein AM/EthD-1 par puit et incuber 15min à 37°C / 5% CO<sub>2</sub>.
- Décanter la solution et ajouter 200 µL de HBSS 1X
- Observer au microscope à fluorescence.
-

## 8.5. Test de prolifération : Alamar blue assay

### Principe :

Le test Alamar consiste à mesurer l'activité métabolique des cellules au cours du temps. Il est basé sur la mesure de la dégradation de la molécule de résazurine, réactif de couleur bleue non fluorescente qui se transforme en un réactif rose fluorescent lorsqu'il est réduit. Cette dégradation est le reflet du métabolisme cellulaire puisqu'elle est assurée par des réductases mitochondriales et cytoplasmiques. L'Alamar n'étant pas toxique pour les cellules, il est possible de répéter ce test sur le même puits à des intervalles de plusieurs jours et ainsi suivre leur prolifération.

### Protocole :

Les paramètres d'impression étaient ceux présentés dans le paragraphe 9-2. Quatre grilles ont été imprimées pour réaliser ce test (= condition co-impression). En parallèle, des cellules MG63 ont été ensemencées dans des puits de culture de 1 cm<sup>2</sup> à une densité de 8 000 cellules/cm<sup>2</sup> en n = 6 puits (= condition Contrôle 2D). Toutes les conditions sont cultivées en milieu IMDM + 10 % SVF + 1 % pénicilline/streptomycine pendant la durée de l'expérimentation.

A chaque temps mesuré :

- Préparer une solution de résazurine (Sigma) en diluant au 1/10 la solution mère (0,1 mg/mL) dans du milieu IMDM + 10 % SVF + 1 % pénicilline/streptomycine.
- Décanter les milieux de culture des cocultures et des cultures contrôles.
- Ajouter 3 mL de la solution fille de résazurine dans les puits des co-cultures et 500 µL dans les puits des cultures contrôles.
- Incuber 3H à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
- Transférer 3 x 150 µL de chaque puit (3 répliques pour chaque N) dans des puits de plaque 96 puits.
- Lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 570 nm

## 8.6. Tests de différenciation ostéoblastique : coloration de la phosphatase alcaline et coloration au rouge alizarin des dépôts minéralisés.

### Principe :

La phosphatase alcaline (ALP) est une glycoprotéine constituée de deux chaînes polypeptidiques qui est fortement exprimée au cours du développement osseux. L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline intracellulaire est un des premiers marqueurs de la différenciation ostéoblastique et peut être mise en évidence par une coloration cytochimique. Elle est révélée dans les cellules par l'interaction du produit d'hydrolyse insoluble du substrat naphthol AS-MX-phosphate avec un sel de diazonium (Fast Blue RR : Sigma) pour former un azodérivé insoluble coloré en bleu/violet (Ackerman, 1962).

Lors du processus de différenciation tardif, les cellules osseuses produisent une matrice minéralisée détectable par un marquage au rouge Alizarin qui colore les nodules calciques en rouge.

### Protocoles :

Les paramètres d'impression sont ceux présentés dans le paragraphe 9-2.

Pour la mise en évidence de l'ALP à J7 et J14 :

- Décanter le milieu cellulaire et rincer au PBS 1X

- Fixer les cocultures avec de la PFA 4% 20min à 4°C
- Décanter la PFA et réaliser 2 rinçages au PBS 1X
- Ajouter par matériau 2mL de solution de détection la PAL (48 mL d'H<sub>2</sub>O + 2 capsules de fast blue RR + 2 mL Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution : Sigma 85L-2)
- Incuber 2h dans l'obscurité à température ambiante.
- Retirer le substrat et ajouter de l'eau du robinet (l'alcalinité de l'eau du robinet accentue la coloration).

Pour la mise en évidence des dépôts minéralisés à J14 et J21 :

- Décanter le milieu cellulaire et rincer au PBS 1X
- Fixer les cocultures avec de la PFA 4% 20min à 4°C
- Décanter la PFA et réaliser 2 rinçages au PBS 1X
- Ajouter par matériau 2mL de solution de rouge alizarin (2% de rouge alizarin dans de l'acide acétique 0,1M(w/v)).
- Laisser incuber 10 min.
- Laver 6 fois avec du PBS 1X

---

## III-RESULTATS EXPERIMENTAUX

---

### 9. Caractérisation du matériau

#### 9.1. Détermination du degré de méthacrylation de la gélatine : TNBS Assay

Le dosage a été mené sur 5 échantillons d'un même lot de production de gélatine méthacrylé. Les résultats ont montré que le taux de méthacrylation pour cette production est de **59,3% ± 1,65%**. Ce degré de méthacrylation est en accord les résultats déjà obtenus dans notre laboratoire avec l'utilisation de ce protocole de synthèse.

#### 9.2. Fabrication du matériau composite imprimable : GelMA10%/A.Hya1,25%/HA4%

A l'issue de la synthèse de l'HA dans la gélatine, nous avons obtenu une solution très homogène de couleur blanche et faiblement visqueuse à 37°C. Cette solution atteignait une viscosité compatible avec l'impression lorsque sa température était comprise entre 25 et 30°C puis elle se solidifiait complètement à des températures inférieures à 25°C.

Disposée dans un moule en PDMS et exposée 1 min aux UVs à 365 nm, la solution se polymérisait pour donner un matériau homogène avec un aspect lisse en surface (Figure 32A et B) qui ne retournait pas à l'état liquide lorsqu'il était mis dans un environnement aqueux à 37°C.

A une température adéquate, il est possible d'imprimer cette solution sur plusieurs couches successives avec un faible étalement sur le support receveur (Figure 32C). En polymérisant chaque couche successivement aux UVs, il est possible d'obtenir des structures tridimensionnelles macroscopiques de plusieurs millimètres de hauteur. (Figure 32D).

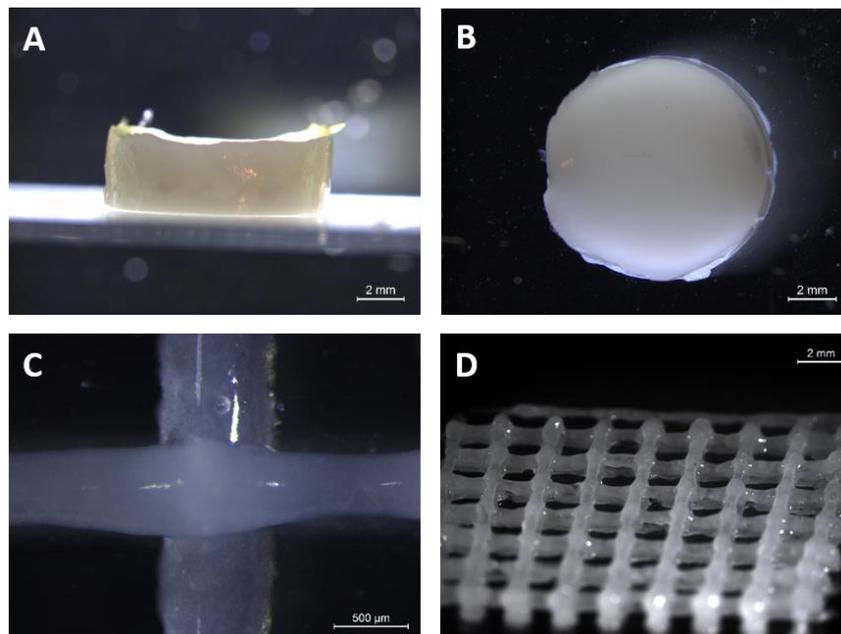


Figure 32: Visualisation à la loupe du matériau GelMA10%/HA4%/A.hya1,25% après polymérisation aux UVs. A et B) Matériau moulé vu de côté et du dessus. C) Photographie de deux traits d'impression perpendiculaires réalisés sur 2 couches distincts après polymérisation aux UVs. D) Photographie d'une construction en grille de 6 couches successives de 0,2 mm/couche.

### 9.3. Rhéologie :

Pour cette expérimentation, le matériau test (GelMA 10% + A.Hya 1,25% + HA 4% + LAP 0,5%) a été comparé au matériau témoin (GelMA 10% + A.Hya 1,25% + LAP 0,5%). L'expérience a été réalisée en triplicata.

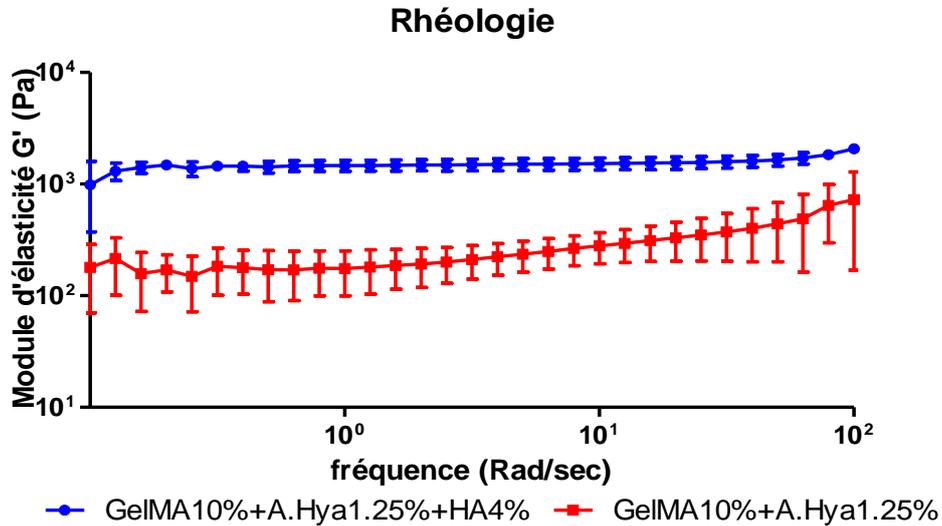


Figure 33: Résultats du test de rhéologie

Les résultats du test de rhéologie montrent plus grande viscoélasticité pour le matériau contenant l'HA ( $G'$  moyen = 1510 Pa) par rapport au matériau sans HA ( $G'$  moyen = 275 Pa) (Figure 33). Ces résultats sont en accord avec les données que l'on peut trouver dans la littérature pour des hydrogels de gélatine (Van Den Bulcke et al., 2000). Ces résultats ont montré que la synthèse de l'HA dans la gélatine méthacrylée rendait le matériau moins cassant que la gélatine méthacrylée simple. Cette propriété est importante car une bonne viscoélasticité limite la dégradation du matériau due aux contraintes mécaniques.

### 9.4. Swelling Test :

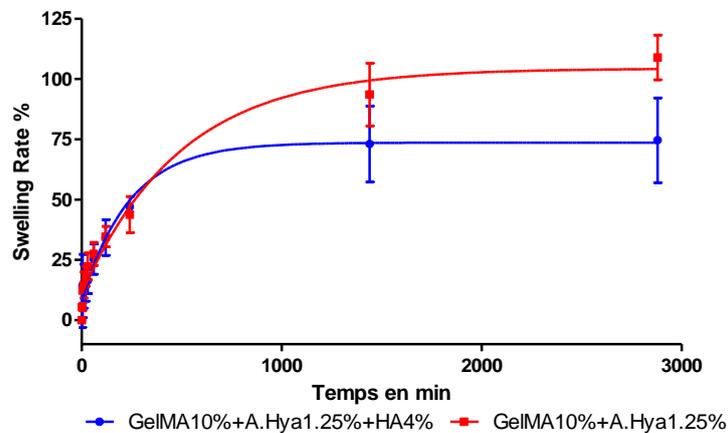


Figure 34: Résultats du test de Swelling test

Les résultats du test de gonflement montrent qu'à partir de 16h dans le milieu aqueux, les deux matériaux atteignent un gonflement maximal qui se maintient à 48h. Les valeurs plateau observées à 48h sont d'environ 73% pour le matériau contenant l'HA et de 104% pour le matériau sans HA (Figure 34). Cette différence de taux de gonflement entre les deux matériaux pourrait s'expliquer par une différence dans les interactions ioniques dues aux particules minérales et notamment à la présence d'ions calcium.

Ce résultat est particulièrement intéressant en impression 3D car il permet de faire des extrapolations sur le gonflement du matériau. Cela nous permettra d'adapter le schéma d'impression afin de préserver la porosité de la construction.

### 9.5. Microscopie Electronique à Balayage :

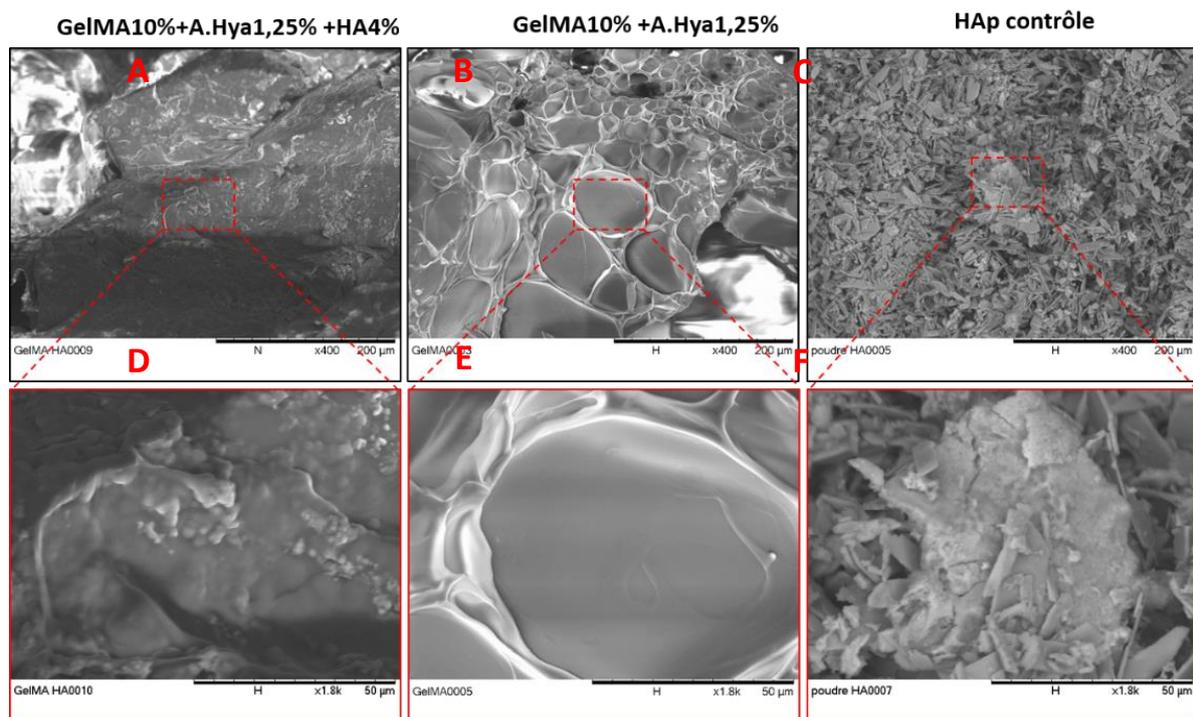


Figure 35: Imagerie des matériaux par Microscopie électronique à balayage. A et D) GelMA10% + A.Hyaluronique1,25 % + HA4%. B et E) GelMA10% + A.Hyaluronique1,25 %. C et F) Particules d'HA synthétisées dans de l'eau.

Les observations en microscope électronique à balayage montrent une différence d'aspect entre le matériau contenant de l'HA et son contrôle sans HA. En effet, nous pouvons observer que notre matériau avec HA (Figure 35: A et D) a une surface qui semble plus rugueuse que celle du matériau sans HA (Figure 35: B et E). En parallèle, nous avons réalisé une synthèse de particules d'hydroxyapatite en suivant le même protocole que celui utilisé pour la synthèse de l'HA dans la gélatine mais en remplaçant la gélatine par de l'eau (Annexe 2). L'imagerie de ces particules d'HA montre la formation d'agrégats de plaquettes faisant quelques dizaines de micromètres (Figure 35: C et F). Une hypothèse possible est que ces plaquettes mélangées à la gélatine soient responsables de cette rugosité dans le matériau avec HA. Néanmoins, nous n'avons pas observé de réelles formes des plaquettes cristallines sur notre matériau avec HA.

## 9.6. Dégradation hydrolytique :

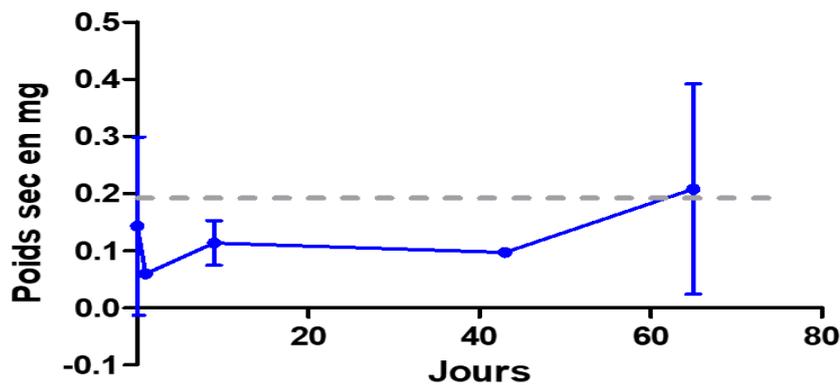


Figure 36: Résultats du test de suivi de la dégradation hydrolytique du GelMA10% + A.Hya1,25% + HA4%.

L'analyse des résultats du test de dégradation hydrolytique (Figure 36) montre une légère tendance à la dégradation du matériau après 40 jours dans le PBS, puis cette dégradation n'apparaît plus au-delà de 65 jours. Les résultats de cette expérience ne permettent pas de conclure sur la dégradabilité du matériau pour plusieurs raisons : tout d'abord, en réalisant les premiers temps du test, nous nous sommes aperçus que la méthode employée par la norme n'était pas adaptée. Cette norme permet de suivre la dégradation d'un polymère de façon longitudinale. En effet, le polymère sec est pesé au temps 0, puis hydraté dans le PBS. Au temps x, il est séché, pesé, puis remis dans le milieu aqueux jusqu'au prochain temps. Dans le cas de notre hydrogel il a été impossible de suivre le même échantillon au cours du temps car la déshydratation au moment de la pesée était destructive pour notre matériau. Nous avons donc synthétisé un lot de matériaux à sacrifier à chaque temps de mesure. La nature visqueuse du matériau a induit des variations de volume au moment du dépôt des 700 $\mu$ L pré-polymérisation et donc de poids ce qui a induit des biais importants.

Face à ces variations inter-échantillons observées, il sera nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons pour pouvoir conclure sur cette expérience.

## 9.7. Analyse Thermo Gravimétrique

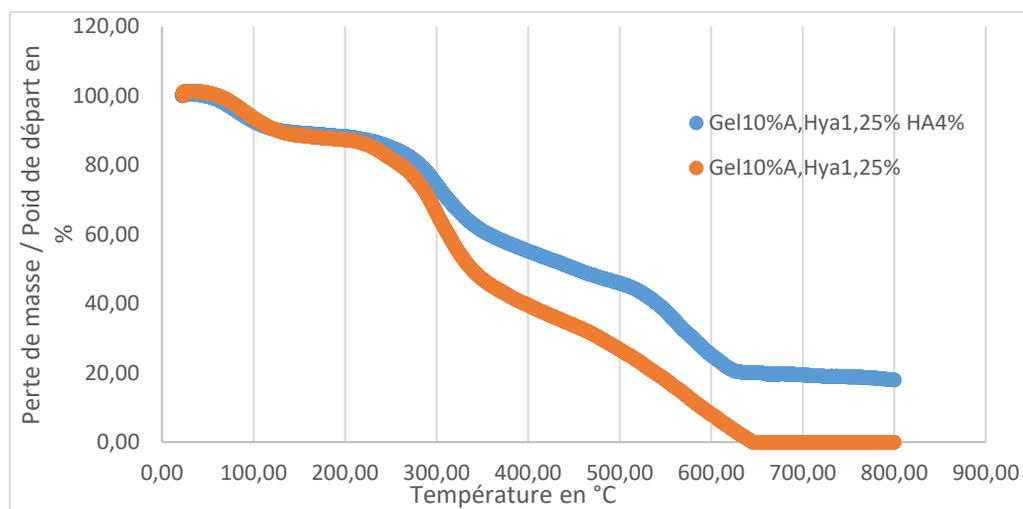


Figure 37: Résultats de l'analyse thermo gravimétrique de la perte de masse du matériau en fonction de la température.

Les résultats de l'ATG montrent un profil de perte de masse en fonction de la température compatibles avec la littérature pour la gélatine (Pourjavadi and Soleyman, 2011). De 0 à 110°C, la perte de masse est due à l'eau résiduelle qui s'évapore puis de 110°C à environ 600°C, c'est toute la partie organique du matériau qui est éliminée. Après 600°C nous pouvons voir que le matériau contrôle sans HA a disparu (Figure 37 en orange), alors qu'il reste 20% du poids sec dans notre matériau test avec hydroxyapatite (Figure 37 en bleu).

Etant donné que le poids sec de la GelMA10% + A.Hya1,25% + HA4% représente environ un quart du poids du matériau hydraté, la partie minérale représente donc environ 4 à 5% de l'hydrogel hydraté. Ces résultats confirment expérimentalement la charge d'hydroxyapatite théorique (4%) fixés lors de la synthèse dans la gélatine méthacrylée.

## 9.8. Diffraction des Rayons X

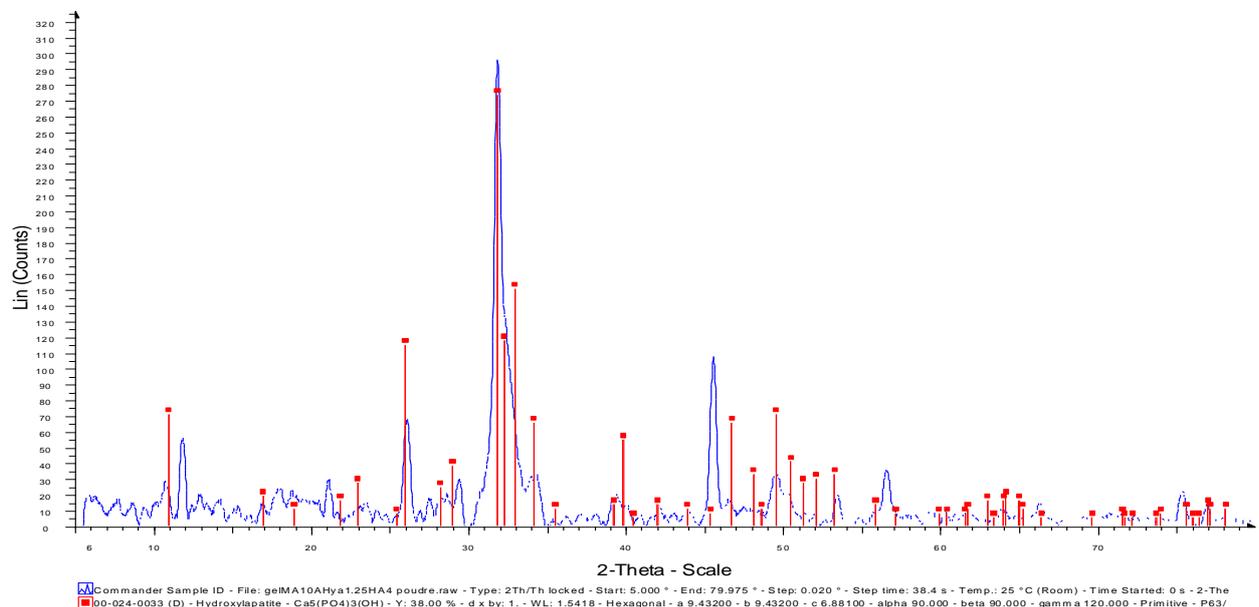


Figure 38 : Caractérisation de la GelMA10% + A.Hya1,25 % + HA4% par DRX. En bleu le diagramme de du matériau et en rouge les pics de référence de l'hydroxyapatite

Le diagramme de la DRX (Figure 38) montre qu'il y a une correspondance partielle de notre phase minérale avec les pics de références de l'hydroxyapatite. Cela signifie que nous avons réussi à synthétiser de l'hydroxyapatite dans notre gélatine, mais avec une faible quantité de formation cristalline.

## 10. Caractérisation de l'impression

### 10.1. Impression de lignes :

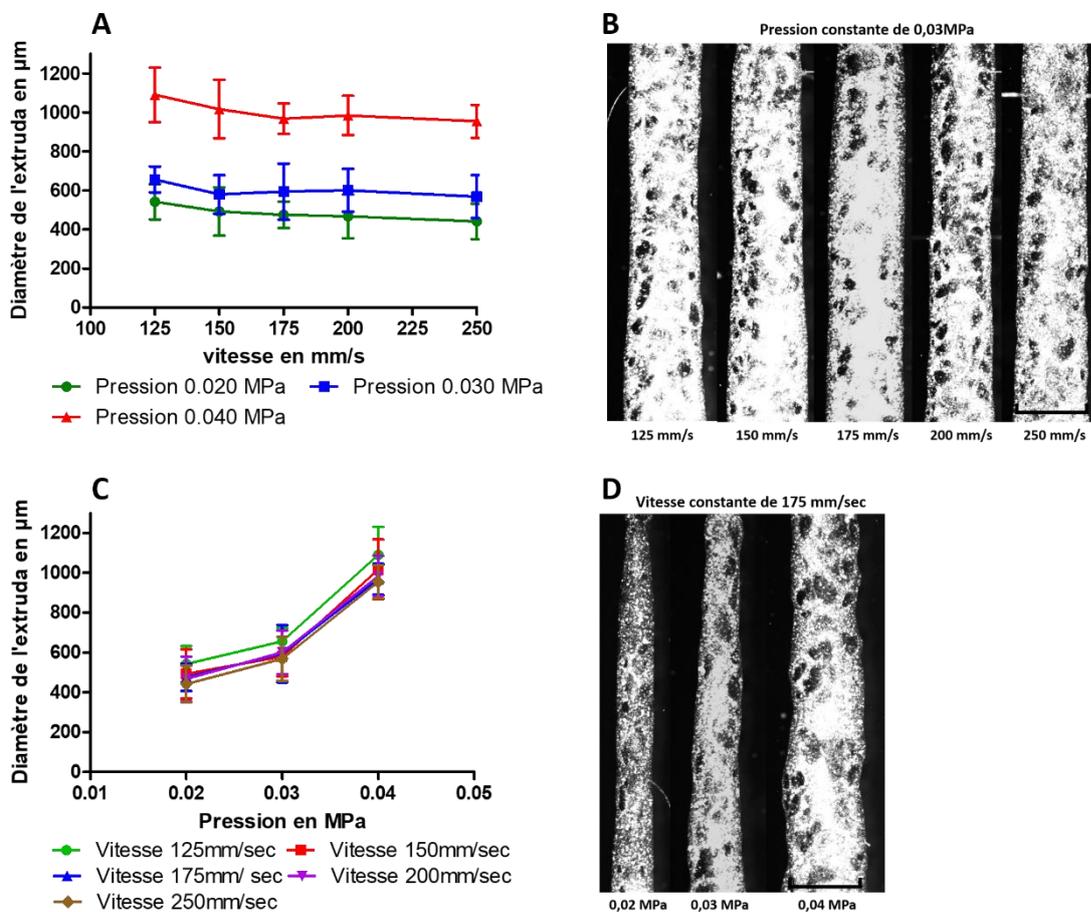


Figure 39 : Mesure du diamètre des lignes post-impression. A et B Résultats quantitatifs et qualitatifs de l'impression de lignes à pression constante et à vitesse variable. C et D Résultats quantitatifs et qualitatifs de l'impression de lignes à pression variable et à vitesse constante. Barre d'échelle = 1mm. Pour chaque ligne imprimée, 40 à 60 mesures de la largeur ont été réalisées

Les résultats du test d'impression de ligne ont montré qu'à pression constante, la variation de la vitesse d'impression n'avait que très peu d'effet sur la taille de l'extrudât post impression (Figure 39A). A 0,02MPa, le diamètre de la ligne passait de  $541 \pm 90 \mu\text{m}$  pour une vitesse d'impression de 125 mm/s à  $441 \pm 109 \mu\text{m}$  pour une vitesse de 250 mm/s soit une variation du diamètre de 18,4%. Pour 0,03 et 0,04 MPa, cette variation était respectivement de 13,5 et 13%. Ces résultats ont été obtenus sur des images de microscopie optique (Figure 39B).

Par ailleurs, à vitesse constante et à pression variable, nous avons observé une augmentation plus importante du diamètre de la ligne imprimée (Figure 39C). A 125 mm/s, le diamètre de la ligne passait de  $541 \pm 90 \mu\text{m}$  pour une pression de 0.02 MPa à  $1090 \pm 139 \mu\text{m}$  pour une pression de 0.04 soit une variation du diamètre de 50,4%. Pour 250 mm/s, cette variation était de 54%. Cette forte variation à 0,04 MPa par rapport à 0,02 et 0,03 MPa a été observée en microscopie optique (Figure 39D).

D'après ces résultats nous pouvons conclure qu'une impression à une pression de 0,02/0,03 MPa et à une vitesse supérieure à 200 mm/s permet d'obtenir une ligne de  $450 \mu\text{m}$  de diamètre environ mais que la taille de l'extrudât déposé restait bien supérieure à la taille du diamètre interne du cône d'extrusion ( $250 \mu\text{m}$ )

## 10.2. Impression de grilles

Contrairement à l'impression de lignes, l'impression de grilles nécessite des ajustements de pression entre chaque grille imprimée. En effet, l'impression nécessite plus de temps que pour les lignes simples ce qui engendre des variations de la température du matériau dans la seringue d'extrusion. La température de la GelMA diminue tandis que sa viscosité augmente. Afin de compenser cette augmentation de la viscosité du matériau, il est nécessaire d'ajuster la pression.

Les analyses quantitatives ont été réalisées sur 9 grilles. Pour chaque grille, 20 à 40 pores ont été analysés après traitement des images avec Image J pour déterminer leur surface et leur périmètre.

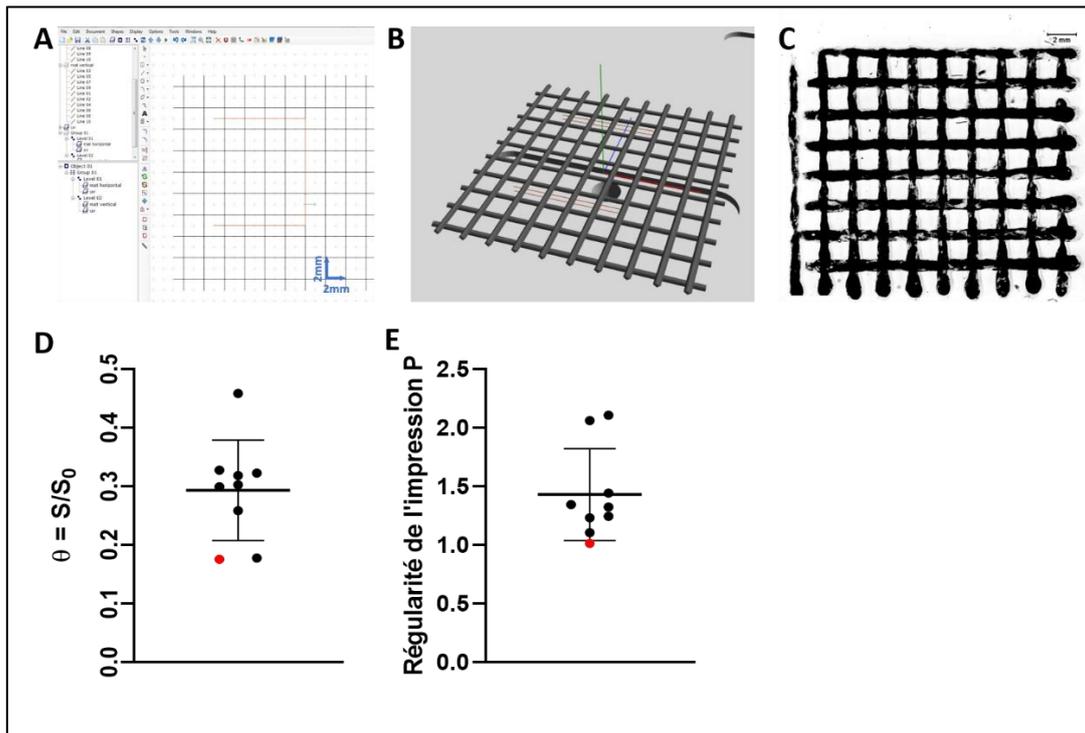


Figure 40: Impression d'une grille et traitement des données. A et B) Modélisation en 2D et en 3D du schéma d'impression de la grille de 1,5 cm de côté avec un espacement de 2mm entre chaque ligne. C) Image assemblée d'une grille représentative post-impression. D et E) Respectivement la résolution d'impression  $\theta$  et la régularité d'impression  $P$ .

Les observations des grilles réalisées post-impression ont montré une grande variabilité de la qualité d'impression d'une grille à l'autre. De plus, comme nous pouvons l'observer sur la Figure 40C, l'impression n'est pas parfaite sur la périphérie de la grille.

La majorité des grilles présentaient des pores de forme carré avec des bordures irrégulières dont la surface totale était en moyenne de  $1,17 \text{ mm}^2 \pm 0,34 \text{ mm}^2$ . Cette surface est environ 3 fois plus petite que celle déterminée lors de la conception sur le logiciel de BioCAD ( $4 \text{ mm}^2$  : Figure 40A). Cette observation a été confirmée par l'évaluation quantitative de la résolution d'impression  $\theta$  qui montre que la surface des pores représente  $29,4 \pm 8,56 \%$  de celle initialement prévue (Figure 40D). Le point rouge sur la Figure 40D et E représente le résultat obtenu pour la grille n°2 qui fera l'objet d'un développement dans la discussion.

Les résultats de l'évaluation de la régularité d'impression montrent qu'en moyenne sur nos 9 grilles imprimées, la valeur de  $P$  est supérieure à 1 (Figure 40D). D'après O'Connell *et al*, cela démontrerait que nous imprimons notre matériau alors que celui-ci a déjà débuté son processus de gélification dans la seringue.

D'après l'ensemble de ces résultats nous pouvons conclure que le modèle imprimé n'atteint pas les valeurs attendues lors de sa conception sur le logiciel en termes de taille des pores. Ceci est tout à fait normal étant donné que le logiciel est indépendant des paramètres d'impression et ne prend pas en compte le diamètre du cône d'extrusion ainsi que l'étalement du matériau sur la surface. L'ensemble de ces paramètres a favorisé une augmentation de la taille de l'extrudât au détriment de la surface vide présente entre les lignes.

## 11. Evaluation biologique

### 11.1. Evaluation cellulaire sans impression

#### 11.1.1. Test de cytotoxicité : MTT / RN

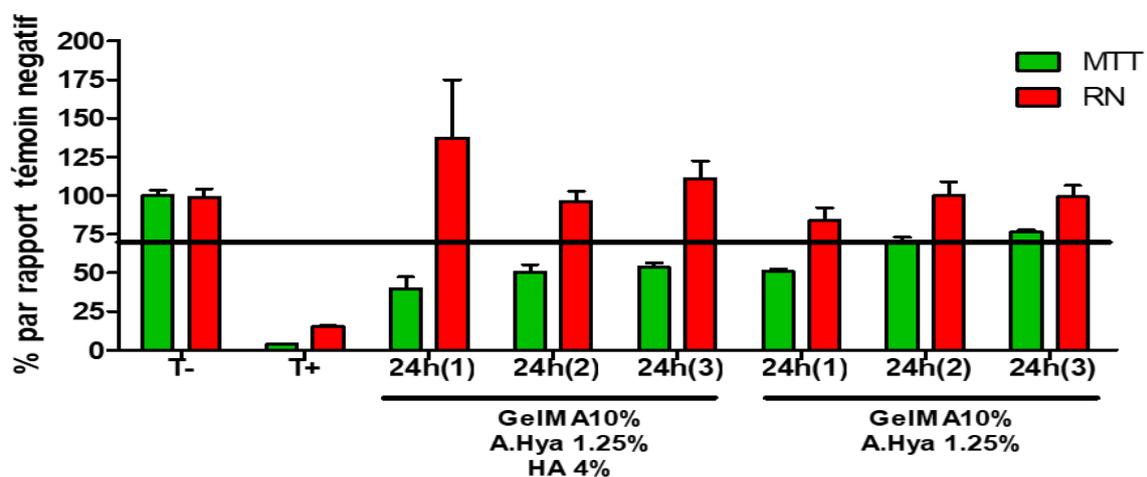


Figure 41: Résultats du test de cytotoxicité MTT/RN de la GeIMA10% + A.Hya1,25 % + HA4% versus GeIMA10% + A.Hya1,25 %. N=6 échantillons

Les résultats du test RN montrent que le matériau avec ou sans HA n'induit pas de toxicité vis-à-vis de la viabilité des MG63 par rapport au témoin négatif (en absence de matériau). Néanmoins, nous pouvons observer avec le MTT que le matériau contenant de l'HA induit une toxicité sur le métabolisme des cellules pour les 3 extraits de matériaux. La formulation sans HA ne présente de la toxicité que dans l'extrait n°1 correspondant aux premières 24h d'extraction. (Figure 41)

### 11.1.2. Test de Viabilité : Live /Dead

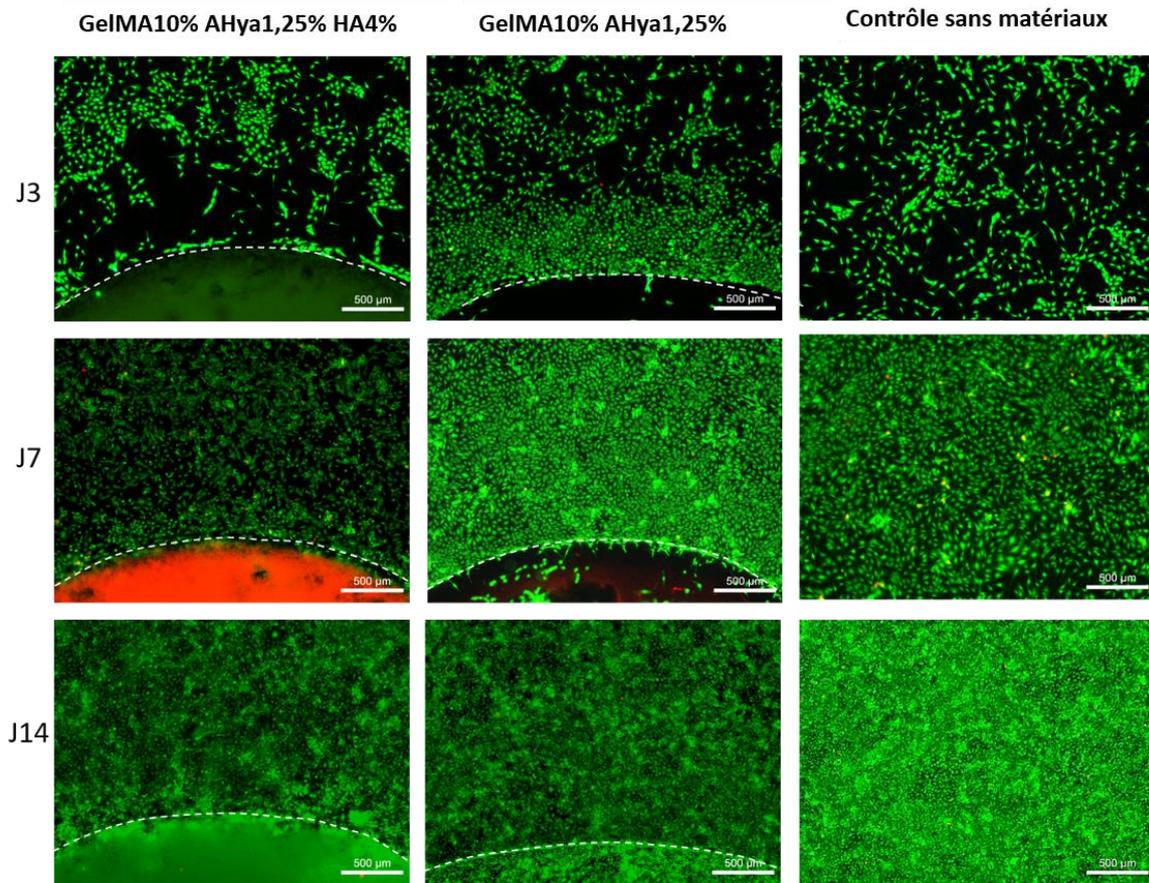


Figure 42: Imagerie à fluorescence du test L/D sans impression réalisé à J3, J7 et J14. En vert, les cellules vivantes, en rouge les cellules mortes. La bordure supérieure du matériau est matérialisée par les pointillés blancs.

Les observations réalisées en microscopie à fluorescence montrent très peu de mort cellulaire chez les MG63 au contact du matériau. A J3, nous observons une faible colonisation des MG63 sur le pourtour du matériau contenant de l'HA par rapport à celui sans HA. Cette différence s'estompe à J7 et fini par disparaître à J14. Nous n'observons pas de colonisation cellulaire sur le matériau contenant de l'HA. Dans la condition matériau sans HA, nous observons dès J7, un début de migration cellulaire du support plastique vers la surface du matériau qui se confirme par l'observation réalisée à J14. (Figure 42)

## 11.2. Caractérisation biologique post impression

### 11.2.1. test de viabilité Live dead

Le but de ce test était d'évaluer la viabilité cellulaire post impression. En effet, nous avons vu précédemment que le matériau n'avait pas d'effet sur la viabilité des MG63 lorsque celles-ci étaient ensemencées dans des plaques de culture au contact du matériau. Ici, les cellules n'étaient plus sur un support 2D mais encapsulées dans un hydrogel d'alg/Ahya et subissaient différents stress qui pouvaient nuire à la viabilité : les étapes de préparation de l'encre cellulaire, les forces physiques générées par l'impression, l'exposition aux UV lors de la réticulation, le contact direct entre le scaffold et l'encre cellulaire.

Il est possible de discriminer les différents effets sur la viabilité cellulaire en réalisant plusieurs expérimentations séparées mais nous avons choisi de présenter seulement l'effet du matériau scaffold sur l'encre cellulaire post-impression. Pour cela, nous avons comparé des live/dead réalisés sur des grilles co-imprimées et sur des grilles d'Alg/Hya contenant des-MG63.

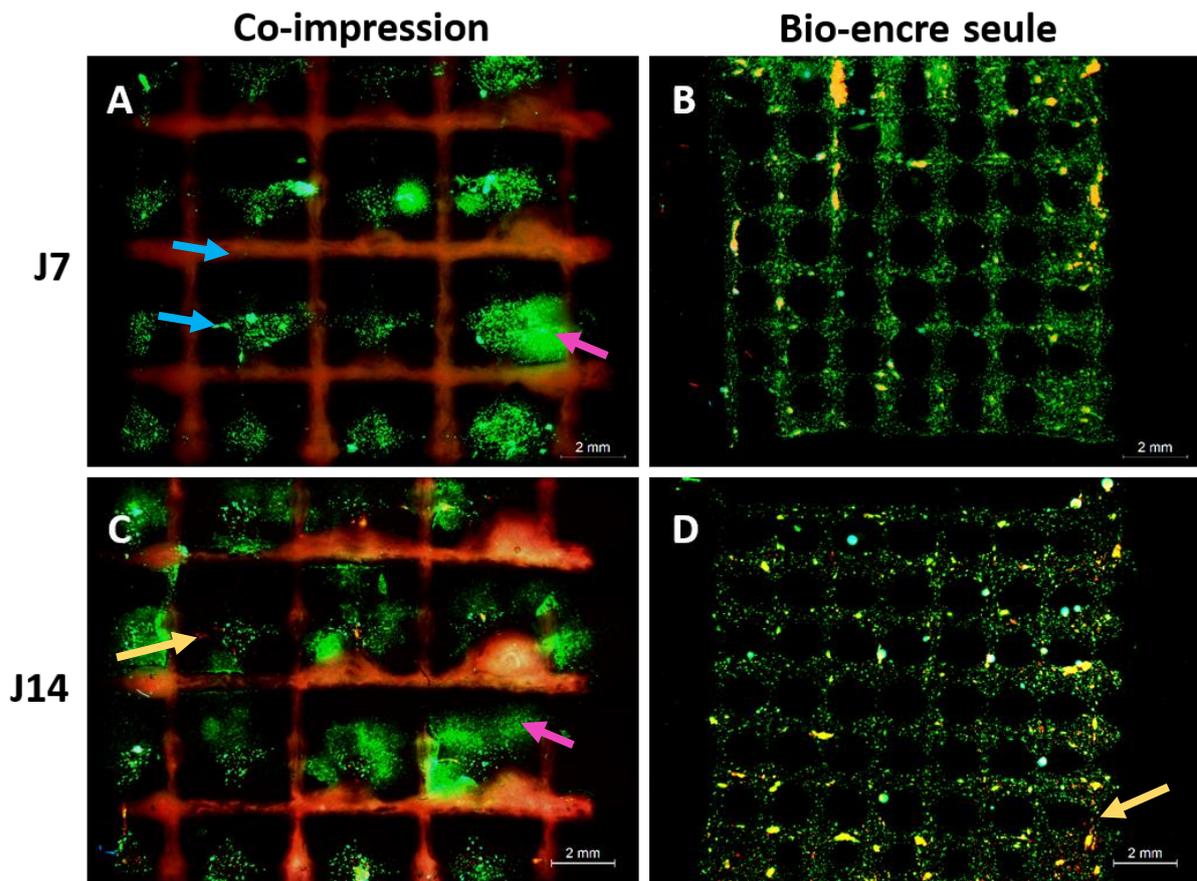


Figure 43: Test de viabilité cellulaire live/dead sur des cellules MG63 post-impression. A et C) Co-impression du scaffold GelMA10%/HA4%/AHya1,25% et de l'encre cellulaire Alg2%/Ahya1%/MG63 respectivement à J7 et J14. B et D) impression de l'encre cellulaire Alg2%/Ahya1%/MG63 respectivement à J7 et J14. En vert les cellules vivantes et en rouge les cellules mortes.

Les observations réalisées à la loupe à J7 et J14 montrent que les cellules co-imprimées avec le scaffold phosphocalcique restent vivantes mais ne semblent pas coloniser le scaffold. Les zones de jonction entre encre cellulaire et scaffold semblent moins cellularisées que les jonctions entre les lignes d'encre cellulaire (flèches bleues). Nous avons pu également observer une migration des cellules de l'encre

cellulaire vers le fond du puits formant des plages de cellules qui prolifèrent en 2D (flèches roses). Le matériau phosphocalcique paraît très auto-fluorescent dans le rouge car à ce grossissement, nous avons dû saturer l'image dans le rouge pour révéler les cellules mortes (flèches jaunes) (Figure 43 A et C). Les grilles témoins uniquement composées d'encre cellulaire présentent une répartition cellulaire homogène ainsi qu'une bonne viabilité cellulaire à J7 qui se maintient à J14. Néanmoins, il semblerait qu'à J14, le nombre de cellules mortes augmente (Figure 43B et D).

### 11.2.2. Test de prolifération : Alamar blue assay

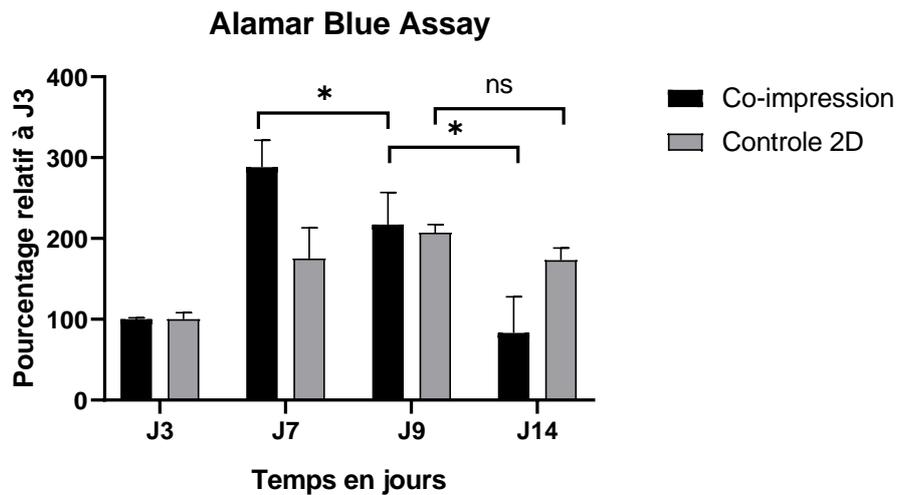


Figure 44: Test de prolifération cellulaire Alamar blue sur les MG63 co-imprimées avec le scaffold phosphocalcique (n=4 grilles) et sur les MG63ensemencées sur des surfaces de culture plastique (n=6 puits). Test statistique : 2 way ANOVA \*P<0.05.

Les résultats du test de prolifération montrent que les cellules co-imprimées avec le matériau phosphocalcique prolifèrent durant la première semaine post-impression puis cette prolifération décroît de façon significative durant les 7 jours suivants. Les cellules contrôlesensemencées en 2D dans des puits de culture prolifèrent jusqu'à atteindre un plateau à J9 qui se maintient jusqu'à J14 (Figure 44).

### 11.2.3. Tests de différenciation ostéoblastique : coloration de la phosphatase alcaline et coloration au rouge alizarin des dépôts minéralisés.

#### ➤ Coloration de la Phosphatase Alcaline (ALP)

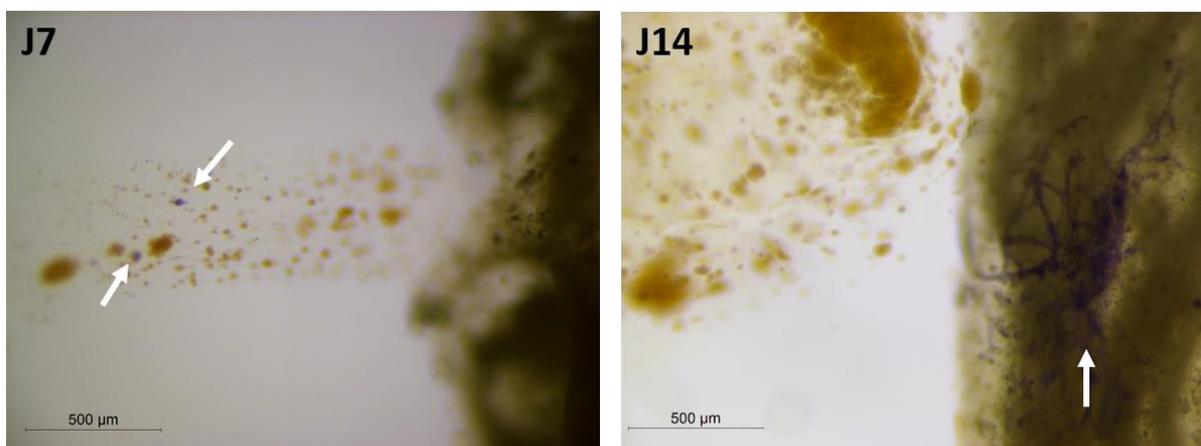


Figure 45: Mise en évidence de l'activité de la phosphatase alcaline des MG63 co-imprimés avec le scaffold phosphocalcique à J7 et J14.

Les observations réalisées après la mise en évidence de l'activité de l'ALP montrent une faible proportion de cellules colorées en bleu/violet (Figure 45). A J7, nous avons pu observer la présence de cellules positives dans des clusters cellulaires présents dans la bio-encre mais leur quantité était minimale au regard du nombre de clusters cellulaires. A J14, le nombre de clusters cellulaires positifs était plus important et nous avons pu observer un faible nombre de cellules colorées en bleu ayant migré sur le scaffold.

#### ➤ Coloration au rouge alizarin des dépôts minéralisés.

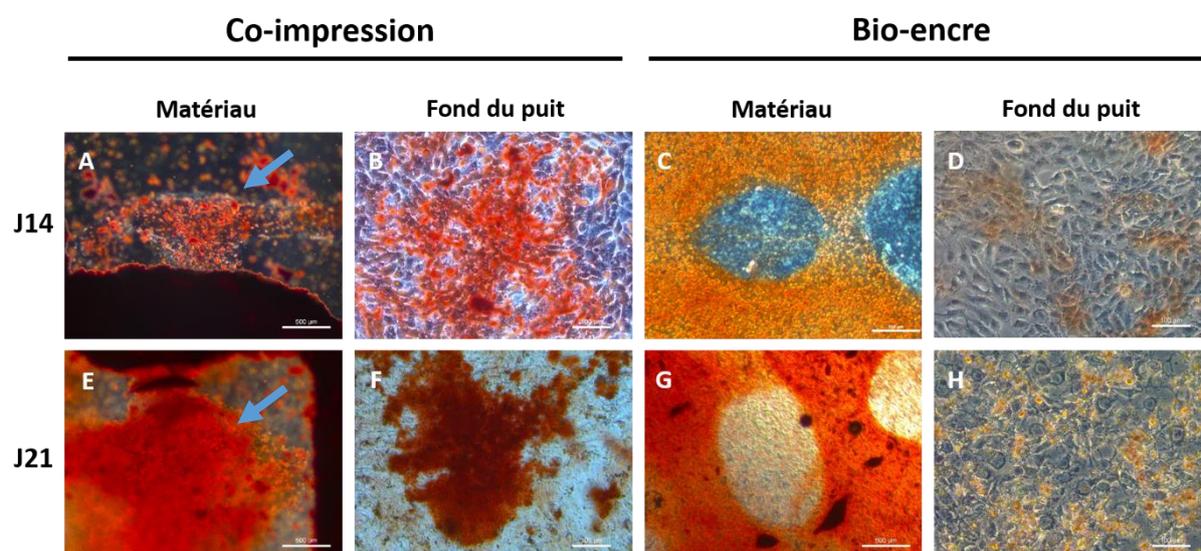


Figure 46: Coloration des dépôts minéralisés au rouge alizarin. A et E) Coloration de l'encre cellulaire co-imprimée avec le scaffold phosphocalcique à J14 et J21. B et F) Observation des dépôts minéralisés sur les fonds de puits de culture contenant

*les co-impressions à J14 et J21. C et G) Coloration de l'encre cellulaire témoin imprimée seule à J14 et J21. D et H) Observation des dépôts minéralisés sur les fonds de puits de culture contenant les impressions d'encre cellulaire témoin à J14 et J21.*

Les résultats des colorations au rouge alizarin ont montré la présence de dépôts fortement minéralisés colorés en rouge dans la bioencre co-imprimée avec le scaffold à J14 et ce signal semble s'accroître à J21 (Figure 46A et E : flèches bleues). Nous avons pu constater également la présence d'une coloration rouge au sein de l'encre cellulaire imprimée seule à J14 dont l'intensité s'accroît à J21 (Figure 46C et G). Afin de discriminer la part de différenciation due à la conformation 3D des cellules de celle due à la présence du scaffold phosphocalcique, nous avons décidé de montrer les résultats des colorations réalisées sur les cellules présentes au fond des puits de culture. Ainsi, nous avons pu observer à J14 et J21 la présence de forts dépôts minéralisés à la surface de la couche cellulaire sur le fond des puits de culture où les co-impressions ont été réalisées (Figure 46B et F). Dans les fonds de puits où l'impression de la bio-encre seule a été réalisée, nous avons observé peu de dépôts minéralisés à J14 et J21 (Figure 46D et H).

---

## IV-DISCUSSION

---

Durant les 3 années du projet nous avons pu appréhender les différentes étapes nécessaires au développement d'un matériau, sa caractérisation physico-chimique et biologique et son application dans le domaine de la bio-impression. Cette expérience nous a permis d'acquérir une meilleure compréhension des éléments à prendre en compte pour le développement d'un matériau mais a aussi soulevé un grand nombre de questions à chaque étape.

Tout d'abord il est nécessaire de discuter l'intérêt du matériau que nous avons développé par rapport à ce qui est déjà décrit dans la littérature et surtout par rapport aux besoins cliniques dans le domaine de la reconstruction osseuse.

D'un point de vu chimique, nous avons pu démontrer la faisabilité de la synthèse d'hydroxyapatite directement dans la gélatine. Cette méthode de synthèse de l'HA développée par Zuo *et al* est particulièrement intéressante pour les applications nécessitant une extrusion de matériau car elle permet de répartir de façon homogène l'ensemble de la phase minérale au sein de la phase aqueuse du scaffold, évitant ainsi l'apparition d'agrégats qui viennent ensuite obstruer les cônes d'extrusion. Cette répartition homogène permet ainsi de pouvoir extruder le matériau avec des cônes de diamètre interne inférieur à 400  $\mu\text{m}$  permettant ainsi d'envisager l'impression de structures plus fines. En comparaison, les équipes de recherche qui travaillent sur des gélatines à concentration similaire (10/15%) dopées avec particules d'HA (0,5% w/v) impriment des structures avec des aiguilles de diamètre interne comprise entre 500 et 600  $\mu\text{m}$ .(Cakmak et al., 2020; Comeau and Willett, 2020).

Nous avons pu observer par ATG que la concentration de phase minérale prévue dans le matériau composite était bien retrouvée dans le produit final et que cette phase minérale contenait de l'hydroxyapatite comme attesté par les analyses en DRX. De plus, l'imagerie réalisée par MEB a permis de mettre en évidence la présence de particules à la surface de la GelMA/Ahya/HA qui ne sont pas présentes dans la formulation GelMA/Ahya. Les résultats de la DRX montrent également une faible cristallinité corroborée par les résultats que nous avons observés au MEB dans notre GelMA avec de l'HA. Pris ensemble, ces résultats pourraient confirmer une synthèse minérale caractérisée par la présence d'hydroxyapatite. Zuo *et al* ont confirmé morphologiquement la présence de cristaux d'hydroxyapatite par microscopie électronique à transmission : ceci devra être réalisé sur notre matériau.

En effet, il serait pertinent de continuer cette caractérisation pour confirmer d'une part, la présence d'hydroxyapatite et sa répartition au sein du matériau et d'autre part, caractériser la présence des autres composés apparus sur les spectres de DRX. Afin de confirmer la présence d'HA et sa répartition, il serait possible de réaliser d'une part une analyse de la surface du matériau par spectroscopie RAMAN avec une cartographie en sélectionnant le pic de la liaison P-O à 960  $\text{cm}^{-1}$  spécifique des cristaux d'hydroxyapatite et d'autre part, évaluer la répartition des cristaux dans le matériau par l'imagerie MicroCT. (Babilotte et al., 2021; Stammeier et al., 2018). Afin de connaître la nature des autres composés potentiellement présents, il serait éventuellement possible de réaliser une analyse par spectrophotométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) ce qui nous permettrait d'identifier et de quantifier les autres éléments chimiques issus de la synthèse incomplète de l'hydroxyapatite

Pour la phase organique, nous avons réalisé une caractérisation qui semble en concordance avec les standards de caractérisation des gélatines méthacrylées à savoir la détermination du taux de méthacrylation, la détermination du taux de gonflement, la caractérisation rhéologique et la réponse cellulaire (test de viabilité et prolifération cellulaire) (Yue et al., 2015).

Concernant la comparaison des propriétés mécaniques, il est difficile de se référer aux propriétés viscoélastiques des matériaux déjà développés dans la littérature. En effet, la concentration de la gélatine, la concentration en acide hyaluronique, la concentration d'hydroxyapatite, le degré de méthacrylation de la gélatine, la concentration et la nature photo-initiateur, la puissance et le temps d'exposition aux UVs sont autant de paramètres dont les variations influencent la réponse du matériau aux contraintes mécaniques. Le  $G'$  de notre matériau ( $10^3$  Pa) semble correspondre aux valeurs adaptées pour l'impression de solution visqueuses. En dessous de cette valeur, les solutions sont trop liquides pour garder leur forme post-impression et au-dessus, elles deviennent trop rigides pour être imprimées avec un cône de 250  $\mu\text{m}$ . Malheureusement la valeur de notre matériau semble être trop faible pour envisager son utilisation seule comme scaffold pour l'ingénierie du tissu osseux : ces matériaux ont habituellement un  $G'$  supérieur à plusieurs dizaines de MPa (Ashammakhi et al., 2019). Même si les propriétés mécaniques ne semblent pas en adéquation avec les besoins du tissu osseux, il pourrait être utilisé pour des études *in vitro* d'ostéodifférenciation qui ne sont pas soumises aux contraintes mécaniques. En effet, il a été démontré que l'impression 3D d'une encre de GelMA 8% /MG63 (avec une concentration en photoinitiateur identique à celle que nous avons utilisée) et un  $G'$  de 1kPa favorisait la production d'une matrice minéralisée de la part des MG63 (McBeth et al., 2017).

Le taux de gonflement d'un matériau est une donnée importante en impression 3D car il va avoir un effet significatif sur la forme finale de la construction (Sun et al., 2018). Les données sur le gonflement dans la littérature sont très variables. Par exemple, dans une étude, une GelMA de 10% avec un degré de méthacrylation de 75% a atteint un taux de gonflement de 700% alors que dans une autre étude, un hydrogel hybride GelMA10%/AHyaMA1% avec un degré de méthacrylation de 80% ne gonflait que de 10% (Camci-Unal et al., 2013; Zhao et al., 2016). Ces différences avec notre matériau GelMA10%/HA4%/Ahya1,25% s'expliquent en partie par la méthode de calcul du gonflement. En effet, nous avons mesuré le gain du poids post-polymérisation alors que dans les autres études, le gain post lyophilisation a été calculé. De plus, le degré de méthacrylation influence de façon significative la capacité de gonflement du matériau : Plus, le taux méthacrylation est élevée, moins le matériau gonfle (Nichol et al., 2010). Dans le cas de notre matériau, nous savons qu'il possède un taux de gonflement de 73%. En se basant sur cette valeur et sur les dimensions connues de notre extrudât post-impression, nous pourrions modéliser les dimensions des pores de notre scaffold en CAO pour obtenir une porosité finale de 300  $\mu\text{m}$  x 300  $\mu\text{m}$  après impression et hydratation. (Figure 47)

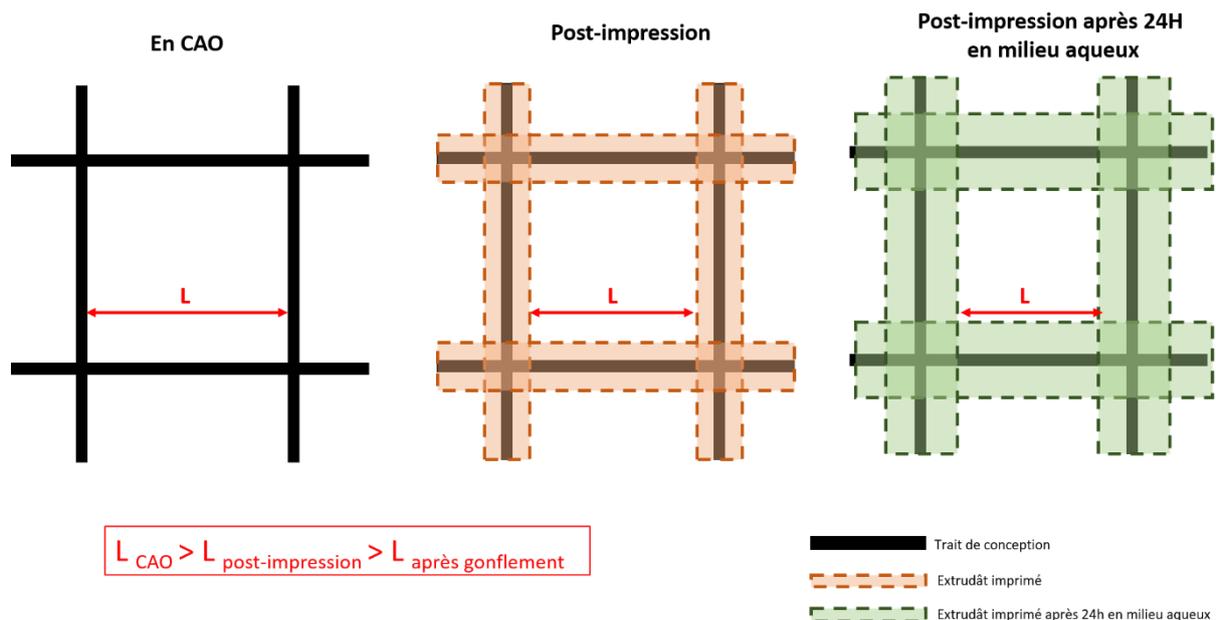


Figure 47: Schématisation de l'effet du gonflement du matériau sur la taille des pores avant et post-impression.

Ainsi, pour compléter l'étude de swelling ratio, il sera intéressant de réaliser une expérimentation de mesure de la taille de la porosité post-impression puis 24h après incubation dans un milieu aqueux pour évaluer la fiabilité de nos prédictions en fonction du gonflement.

Du point de vue de la dégradation du matériau, les données de notre étude ne nous permettent pas de conclure sur le devenir de notre matériau à moyen et long terme *in vitro*. La réponse à cette question est essentielle car on doit s'assurer de l'intégrité de la structure imprimée tout au long de l'étude. Pour une application *in vivo*, les scaffolds sont généralement conçus pour se dégrader à une vitesse similaire à la vitesse de néo-formation du tissu cicatriciel. Ainsi au cours du temps, le matériau laisse place au tissu de remplacement. Cette dégradation physiologique peut-être mimée *in vitro* par l'ajout d'enzymes naturellement présentes dans l'organisme telles que la collagénase ou la hyaluronidase (Camci-Unal et al., 2013). Après une analyse de nos résultats, nous avons conclu que le choix du test de dégradation dans l'eau n'était pas le plus adapté à notre matériau car la variation du poids de l'hydrogel était difficilement détectable. Ainsi, il est plus judicieux d'envisager un test de dégradation dans le milieu de culture avec ou sans enzymes pour se rapprocher des conditions d'étude de la co-impression. De plus, il sera intéressant d'évaluer à la fois la vitesse de dégradation du matériau sous forme de pastille moulée (la condition standard) et celle sur les matériaux imprimés. Cela permettra de voir si l'architecture du scaffold a un rôle sur la dégradation du matériau.

Les résultats de la caractérisation cellulaire que nous avons obtenus montrent que notre matériau relargue dans des temps courts des composés qui ont un effet cytotoxique sur le métabolisme des MG63 (Figure 37). Ces phénomènes toxiques pour le métabolisme cellulaire sont probablement dus à la présence d'HA et à certains éléments chimiques utilisés pour la synthèse minérale. Cependant cet effet cytotoxique ne semble pas perdurer au cours du temps, après plusieurs changements de milieux de culture comme en témoigne le test de viabilité (Figure 38). Ces résultats sont similaires à ceux de Zuo *et al.* qui ont développé la méthode de synthèse de l'HA dans la gélatine méthacrylée (Zuo et al., 2015).

La caractérisation de l'imprimabilité de notre matériau demeure la partie la plus subjective de nos travaux car il n'existe pas de référentiel normé pour évaluer l'adaptabilité d'un matériau à l'impression 3D ou si la construction remplit un certain nombre de critères permettant de conclure sur sa qualité de finition. L'ensemble des critères d'évaluation : vitesse d'impression, la régularité de l'impression, la méthode et le temps de réticulation, les résolutions d'impression... sont autant d'outils qui doivent permettre de qualifier la construction mais l'évaluation de la qualité finale de la construction dépendra essentiellement de l'exigence de l'opérateur et des besoins du tissu à substituer. Les variations entre une impression de bonne ou de mauvaise qualité seront dépendantes de deux facteurs essentiels : 1) Les propriétés physico-chimiques liées au matériau (propriétés rhéologiques du matériau et système de gélification), 2) les paramètres d'impression liés à l'imprimante (pression, vitesse d'impression, cône d'extrusion...)

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes fixés comme but d'imprimer un matériau phosphocalcique avec la meilleure résolution possible. Nous avons fait le choix d'utiliser la technique d'extrusion de l'imprimante « 3D Discovery » de RegenHU. Sans référentiel normé, l'évaluation des conditions d'impression optimales pour notre matériau ainsi que la qualité d'impression ont été réalisées en adéquation avec les données disponibles dans la littérature.

Pour atteindre la meilleure résolution possible, nous avons adapté la consistance de notre matériau pour qu'il puisse être imprimé avec un cône de diamètre interne de 250  $\mu\text{m}$  sans négliger la concentration de 4% de la phase minérale. Pour réussir cela, nous avons fait varier les concentrations de GelMA et d'AHya afin d'obtenir un hydrogel ayant la viscosité nécessaire pour l'impression et un maintien suffisant de la structure avant la polymérisation. Les résultats que nous avons obtenus (Figure 30) sont satisfaisants mais plusieurs points peuvent être discutés. D'un côté, nous avons réussi à imprimer à 250  $\mu\text{m}$ , ce qui est très satisfaisant par rapport aux données de la littérature concernant l'impression de matériaux composites hydrogel/particules minérales. A notre connaissance, les impressions de matériaux phosphocalciques se font habituellement avec des cônes de diamètre internes allant de 400  $\mu\text{m}$  à 1,2mm (Ahlfeld et al., 2018; Bendtsen et al., 2017; Demirtaş et al., 2017). L'utilisation de cônes d'un diamètre plus fin permet d'envisager une microstructure des scaffolds plus fine que celles décrites par les différents auteurs. Malheureusement, malgré les optimisations des conditions d'impression liées à la machine (vitesse d'impression et pression), nous n'avons pas réussi à imprimer de lignes dont le diamètre était inférieur à  $441 \pm 109 \mu\text{m}$ . Les raisons à cela sont multiples et peuvent être dus :

- A la température de la gélatine dans la seringue d'extrusion : Sans système de régulation de la température de la seringue, il est difficile de maintenir le matériau à une température constante durant toute l'impression ce qui engendre une variation de la viscosité du matériau et un manque d'homogénéité de matériau (Wang et al., 2017).
- Au temps entre l'extrusion du matériau et sa polymérisation. Dans notre imprimante, la lampe UV est dissociée de la tête d'impression ce qui implique un temps de latence entre l'impression du matériau et sa polymérisation. Durant ce laps de temps, le matériau est soumis aux forces gravitationnelles que sa viscosité ne peut compenser.

Afin d'améliorer la résolution de nos impressions, plusieurs axes de développement sont possibles. La solution la plus simple mais aussi la plus coûteuse est d'améliorer l'imprimante avec l'ajout d'un corps de chauffe sur la seringue et un plateau d'impression réfrigéré. Le chauffe seringue thermostaté permettrait ainsi de garder le matériau à la bonne température avant l'impression et le plateau réfrigéré permettrait d'accélérer la gélification avant la réticulation définitive aux UVs. L'utilisation de ces deux modules permettrait donc d'améliorer la qualité d'impression sans avoir à modifier le matériau mis au point, malheureusement l'utilisation d'un plateau réfrigéré rendrait la co-impression

plus difficile car le froid généré pourrait léser la viabilité cellulaire de l'encre. Une solution envisageable est de remplacer la gélatine porcine lors de la synthèse de la GelMA par une gélatine « froide » soit d'origine alimentaire soit issue de poisson. C'est en voulant faire face aux mêmes problèmes de versatilité de la température de la GelMA qu'en 2017, Wang *et al* ont réalisé des méthacrylations sur trois sources de gélatine différentes (de porc, de poisson d'eau froide et de la gélatine froide alimentaire : Cold gelatin Instagel™) et ont comparé leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Alors que la gélatine de porc nécessite une dissolution à température de 50°C et se solidifie entre 20 et 25°C, les deux autres sources se dissolvent dans des solutions aqueuses à 20°C et restent liquides à température ambiante. Il en résulte ainsi une meilleure stabilité thermique de la solution à température ambiante et donc un meilleur contrôle de la viscosité. Les résultats de cette étude montrent que la « cold gelatin Instagel » méthacrylée possède le meilleur compromis entre propriétés mécaniques, biologiques et d'imprimabilité par rapport aux deux autres sources. (Wang *et al.*, 2017). Pour résoudre les problèmes de temps de latence entre déposition et polymérisation, nous n'avons pas pour l'instant, de solutions pour notre imprimante car le module UV est séparé de la tête d'impression. Certains modèles d'imprimantes 3D sont équipés de tête d'extrusion avec un module UV ce qui permet de réticuler les hydrogels photosensibles dès leur sortie du cône d'extrusion, ce qui supprime le temps de latence entre impression et polymérisation. (Figure 48)(Kretzschmar *et al.*, 2019).

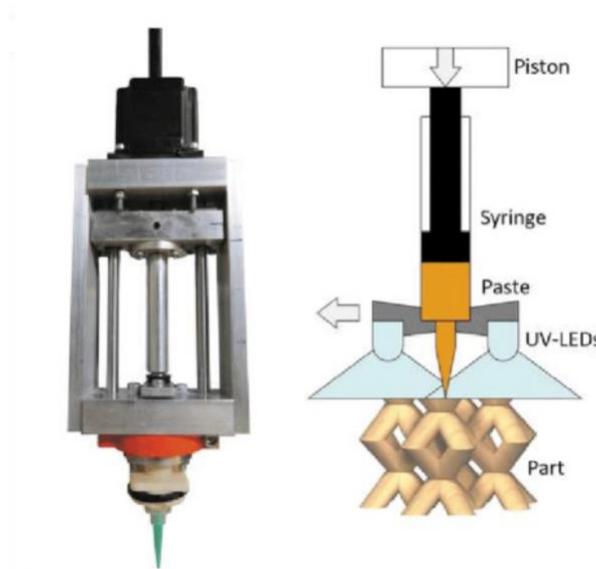


Figure 48: Photographie de la tête d'extrusion équipée d'une source UV et la schématisation de son principe de fonctionnement. (Kretzschmar *et al.*, 2019).

Un autre point important de notre travail a été l'évaluation de la régularité de l'impression  $P$  qui a montré qu'en moyenne nous avons imprimé un matériau dont le processus de gélification avait débuté avant même l'impression (Figure 40 E). Lorsque le matériau imprimé est trop liquide, il forme des grilles avec des pores aux contours circulaires avec une valeur  $P < 1$ . A la bonne viscosité, les pores sont carrés avec des contours réguliers ( $P = 1$ ) et lorsque le matériau est gélifié avant l'impression, les contours des pores ont des formes anarchiques ( $P > 1$ ) (Figure 31). Cependant, nous avons pu observer que sur une grille imprimée avec un matériau trop liquide, nous obtenions une valeur de  $P = 1$  en appliquant la formule mathématique décrite par O'Connell *et al* (Annexe 4). Les résultats du traitement des données de cette grille n°2 était étonnant car expérimentalement, le matériau imprimé semblait trop liquide pour maintenir une forme correcte avant la réticulation. Malgré la mauvaise qualité de cette impression, nous avons traité les images de façon identique aux autres grilles et obtenu une valeur de

P très proche de 1. Ainsi nous sommes posés la question de la pertinence et de la reproductibilité de la méthode de calcul décrite par *O'Connell et al* pour évaluer la régularité d'impression.

Concernant la co-impression, nous avons pu démontrer la faisabilité d'imprimer simultanément notre matériau phosphocalcique et une encre cellulaire contenus dans deux têtes d'impressions séparées. Les résultats ont montré une viabilité cellulaire satisfaisante sur 14 jours malgré une baisse notable de la prolifération cellulaire. Cette baisse de la prolifération n'est pas corrélée à une apparente augmentation de mortalité des cellules au sein de l'encre. En outre, nous avons pu observer tout au long de l'étude, un nombre croissant de cellules au fond des puits de culture qui contenaient les constructions imprimées. Une des hypothèses probables pour expliquer ce phénomène pourrait être la capacité des MG63 à surexprimer la hyaluronidase lorsqu'elles sont dans un processus de minéralisation (Adams et al., 2006). En effet, lors de la minéralisation, les MG63 pourraient sécréter plus de hyaluronidase ce qui entrainerait une dégradation plus rapide de l'encre cellulaire libérant ainsi les cellules qui finiraient par adhérer et proliférer au fond du puit.

Nous avons pu aussi mettre en évidence la présence de quelques cellules ALP positives et révéler la présence d'une minéralisation de la matrice grâce à la coloration au rouge Alizarine. Ces résultats préliminaires sont encourageants pour la poursuite de cette étude. En effet le potentiel ostéo-inducteur de notre matériau nécessitera donc une étude plus approfondie et éventuellement un changement de notre modèle cellulaire. En effet, comme le montre la Figure 49, le profil d'expression des gènes exprimés par les ostéoblastes (OB) est partiellement différent de celui des MG63. Ainsi nous pouvons observer qu'en milieu de culture basal, les MG63 expriment très peu l'ALP ce qui pourrait expliquer en partie les résultats obtenus.

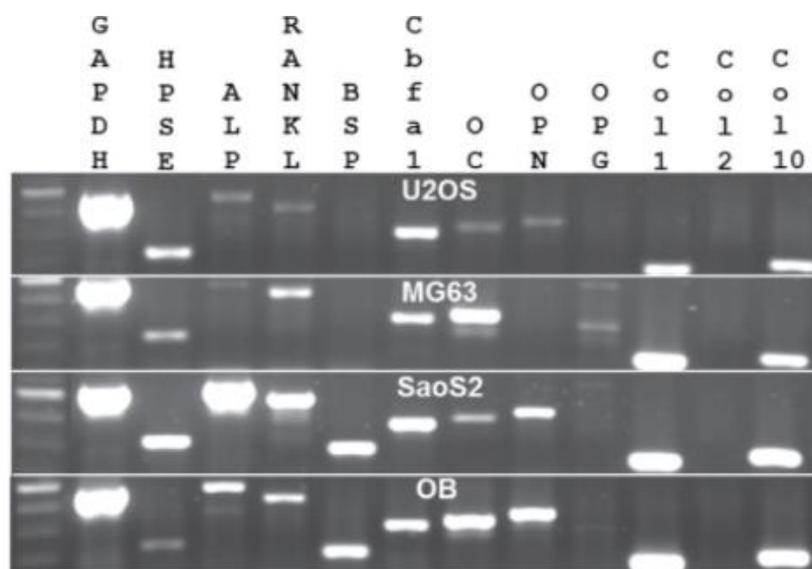


Figure 49: Comparatif des profils d'expression des gènes ostéoblastiques exprimés par des lignées cellulaires issues d'ostéosarcomes (U2OS, MG63 et SaoS2) et une culture primaire d'ostéoblastes (OB). (Burmester et al., 2014)

Il sera donc nécessaire de poursuivre ces études de différenciation cellulaire par une répétition des expérimentations déjà engagées puis réaliser une analyse plus fine du phénotype cellulaire par RTqPCR afin de déterminer le niveau d'expression des gènes impliqués dans le processus de différenciation ostéoblastique.

---

## V-CONCLUSION

---

Dans la première partie de l'étude dédiée au développement et à la caractérisation du matériau nous avons pu démontrer la faisabilité de produire un matériau phosphocalcique en synthétisant la phase minérale directement dans la phase organique (gélatine méthacrylée).

Les résultats de la caractérisation de la phase minérale par ATG, DRX et MEB tendent à confirmer la présence d'hydroxyapatite partiellement cristalline à une concentration avoisinant les 4%.

Les résultats de caractérisation de la phase organique nous ont permis de mieux comprendre le comportement de notre matériau en présence de contraintes mécaniques et son devenir en milieu aqueux. En effet, nous avons pu montrer par la rhéologie et le swelling test que la synthèse d'HA dans la gélatine augmentait les propriétés viscoélastiques de la gélatine méthacrylée mais que cette synthèse limitait le gonflement du matériau. Les résultats du test de dégradation hydrolytique ne nous permettent pas de conclure de façon fiable et précise sur la cinétique de dégradation du matériau en milieu aqueux mais nous donnent seulement des indications sur la faible dégradation du matériau aux cours des premières semaines.

Dans la seconde partie de l'étude dédiée à l'optimisation et à la caractérisation de l'impression du matériau phosphocalcique, nous avons pu mettre en œuvre une étude standardisée pour évaluer la qualité de nos produits imprimés.

Ainsi, les expérimentations menées pour optimiser les conditions d'impression du matériau phosphocalcique nous ont permis de déterminer qu'il était possible d'imprimer des lignes régulières de notre matériau et que la pression exercée pour extruder le matériau avait un effet plus important sur le diamètre de l'extrudât que la vitesse d'impression. Nous avons pu également observer lors de l'impression des grilles, que nous imprimions un matériau pré-gélifié dans la seringue ce qui avait pour conséquence une mauvaise régularité de la forme des pores au sein de la grille. Nous avons déterminé que ces pores étaient en moyenne trois fois plus petits que la taille désirée. Ceci n'est pas délétère pour la suite du développement du produit mais sera à prendre en considération dans une construction de forme plus complexe afin de préserver la porosité.

Durant ces expérimentations, nous avons aussi identifié la principale lacune de ce matériau qui est sa thermo versatilité. En effet, si ce paramètre n'avait pas eu d'importance lors de la caractérisation du matériau, il est devenu problématique lors de l'impression engendrant à *minima* des variations de la viscosité qui influencent la forme du scaffold et dans les pires cas une gélification dans la seringue d'extrusion rendant l'impression impossible.

La dernière partie de l'étude concernait la faisabilité de co-impression du matériau phosphocalcique développé avec une encre cellulaire composée de MG63 et l'évaluation de potentiel ostéoinducteur du matériau phosphocalcique. Cette dernière partie de l'étude a subi de nombreux retards dus au temps nécessaire au développement du matériau phosphocalcique et à la situation sanitaire exceptionnelle que nous avons vécu sur la dernière année du projet.

Néanmoins les premiers résultats ont montré que le co-impression d'une encre composée d'alginate, d'acide hyaluronique et des MG63 était possible avec notre matériau phosphocalcique bien que la

régularité de l'impression de cette encre reste à optimiser. Nous avons pu également montrer que les cellules imprimées proliféraient durant la première semaine de culture avant de décliner. Le test Live /dead a révélé que les cellules restaient viables après deux semaines de culture mais que celles-ci présentaient une forte mortalité aux jonctions encre/scaffold. Une raison probable à cette toxicité de contact réside peut-être dans la taille des particules de HA. En effet, il a été démontré qu'en fonction de leur taille, les particules d'hydroxyapatite pouvaient avoir un effet pro-apoptotique sur les MG63. Dans leur étude, les auteurs ont montré que les particules d'HA dont la taille était supérieure à 80 nm avait un effet délétère sur la morphologie des cellules et ils ont pu observer par cytométrie en flux une augmentation de l'apoptose des cellules au contact d'HAp > à 80 nm par rapport à des cellules exposées à de l'HAp = 20 nm (Shi et al., 2009). Associés au précédent test de cytotoxicité, ces résultats pourraient confirmer que le matériau phosphocalcique nuit à court terme au développement et à la viabilité cellulaire lorsque les cellules sont en contact direct avec le matériau.

La caractérisation du pouvoir ostéoinductif de notre matériau a montré qu'une faible quantité des cellules co-imprimées exprimaient la phosphatase alcaline durant les premières semaines de culture et que des nodules de minéralisation apparaissaient au sein de la bio-encre co-imprimée dès J14. Les colorations au rouge alizarine réalisées sur les fonds de puits tendent à montrer un effet du matériau scaffold sur le développement d'une matrice minéralisée. L'ensemble de ces résultats est encourageant sur le potentiel ostéoinductif du GelMA/Ahya/HA mais nécessite une répétition des expérimentations ainsi qu'une investigation plus poussée sur le phénotype des cellules.

---

## VI-PERSPECTIVES

---

L'objectif principal de cette étude a été de démontrer la faisabilité de la co-impression d'un biomatériau « scaffold » phosphocalcique et d'une encre cellulaire pour la création d'un modèle de substitut osseux par impression 3D. Nous avons pu démontrer dans ce projet que l'utilisation d'une imprimante 3D avec plusieurs têtes d'impression permettait d'imprimer simultanément un scaffold phosphocalcique et une encre cellulaire viable de façon hiérarchisée.

Cette approche « Bottom-up » utilisant le bioprinting pour créer une structure tridimensionnelle organisée où le scaffold est imprimé simultanément avec les cellules pourrait permettre de lever certains verrous technologiques communément observés avec l'approche classique dite « Top-down » : Mauvaise diffusion des nutriments et de l'oxygène au sein du biomatériaux, manque de néo-vascularisation et répartition cellulaire non-organisée.

L'objectif secondaire de cette étude était de développer un matériau phosphocalcique co-imprimable et biocompatible afin de proposer une alternative aux matériaux commerciaux. Ce matériau devait être utilisable par extrusion, apporter toutes les propriétés mécaniques nécessaires à un substitut osseux, être biocompatible et ostéo-inducteur. Pour cela, nous avons développé une gélatine méthacrylée avec une synthèse d'hydroxyapatite *in situ* permettant d'obtenir un matériau dont la phase minérale est répartie de façon homogène dans l'ensemble de la phase organique. Les principaux avantages de ce matériau sont : 1) La répartition homogène de la phase minérale qui limite l'obstruction de la tête d'extrusion de l'imprimante. 2) Sa biocompatibilité et 3) Son faible coût de production et une facilité de synthèse.

Cependant, le point faible de ce matériau est de ne pas posséder les caractéristiques mécaniques nécessaires à son utilisation comme substitut osseux *in vivo* et présente une instabilité de sa viscosité en pré-impression qui peut être préjudiciable sur la qualité de la construction. Afin d'améliorer ses qualités mécaniques, nous envisageons d'augmenter le pourcentage d'hydroxyapatite.

A cause de ses faibles capacités mécaniques, son usage en site implantatoire ne semble pas être possible pour le moment. Néanmoins, nous allons continuer les investigations sur ce matériau afin de développer un modèle osseux organisé *in vitro*. Ce nouveau modèle pourrait être utilisé en contact direct avec d'autres biomatériaux (ex : implants en titane) afin d'évaluer *in vitro* les phénomènes physico-chimiques et biologiques qui ont lieu à l'interface d'un biomatériau et du tissu osseux.

D'un point de vue personnel, ces trois années ont été très enrichissantes car elles m'ont permis d'appréhender tout le processus de caractérisation nécessaire au développement d'un biomatériau, d'acquérir des connaissances sur les caractérisations physico-chimiques et sur la bio-impression. J'ai pu aussi découvrir la difficulté de mettre en place des collaborations autour de ce projet, pour élaborer un matériau phosphocalcique imprimable respectant le cahier des charges d'un biomatériau utilisable en régénération osseuse. Au regard du peu de produits disponibles sur le marché et de l'évolution de l'impression 3D dans le domaine du biomédical, il y aura probablement des débouchés commerciaux intéressants dans ce domaine.

Pour terminer, je suis très heureux d'avoir eu l'opportunité de mener à bien ce projet en toute autonomie et avec la confiance de ma hiérarchie malgré les difficultés liées à la crise sanitaire au cours de cette de la dernière année.

---

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Ackerman, G.A., 1962. Substituted naphthol AS phosphate derivatives for the localization of leukocyte alkaline phosphatase activity. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 11, 563–567.
- Adams, J.R.J., Sander, G., Byers, S., 2006. Expression of hyaluronan synthases and hyaluronidases in the MG63 osteoblast cell line. *Matrix Biol.* 25, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.08.007>
- Ahlfeld, T., Doberenz, F., Kilian, D., Vater, C., Korn, P., Lauer, G., Lode, A., Gelinsky, M., 2018. Bioprinting of mineralized constructs utilizing multichannel plotting of a self-setting calcium phosphate cement and a cell-laden bioink. *Biofabrication* 10, 045002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aad36d>
- Angelopoulos, I., Allenby, M.C., Lim, M., Zamorano, M., 2020. Engineering inkjet bioprinting processes toward translational therapies. *Biotechnol. Bioeng.* 117, 272–284. <https://doi.org/10.1002/bit.27176>
- Anselme, K., 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21, 667–681. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2)
- Antich, C., de Vicente, J., Jiménez, G., Chocarro, C., Carrillo, E., Montañez, E., Gálvez-Martín, P., Marchal, J.A., 2020. Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs. *Acta Biomater.* 106, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.046>
- Arbez, B., Manero, F., Mabileau, G., Libouban, H., Chappard, D., 2019. Human macrophages and osteoclasts resorb  $\beta$ -tricalcium phosphate in vitro but not mouse macrophages. *Micron* 125, 102730. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.102730>
- Asada, N., Katayama, Y., Sato, M., Minagawa, K., Wakahashi, K., Kawano, H., Kawano, Y., Sada, A., Ikeda, K., Matsui, T., Tanimoto, M., 2013. Matrix-Embedded Osteocytes Regulate Mobilization of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 12, 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.001>
- Ashammakhi, N., Ahadian, S., Xu, C., Montazerian, H., Ko, H., Nasiri, R., Barros, N., Khademhosseini, A., 2019. Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. *Mater. Today Bio* 1, 100008. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100008>
- Babilotte, J., Guduric, V., Le Nihouannen, D., Naveau, A., Fricain, J.-C., Catros, S., 2019. 3D printed polymer-mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 107, 2579–2595. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34348>
- Babilotte, J., Martin, B., Guduric, V., Bareille, R., Agniel, R., Roques, S., Héroguez, V., Dussauze, M., Gaudon, M., Le Nihouannen, D., Catros, S., 2021. Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 118, 111334. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111334>
- Bellido, T., 2014. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcif. Tissue Int.* 94, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>
- Bendtsen, S.T., Quinnell, S.P., Wei, M., 2017. Development of a novel alginate-polyvinyl alcohol-hydroxyapatite hydrogel for 3D bioprinting bone tissue engineered scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* 105, 1457–1468. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36036>
- Boitere, A., 2017. ACCES Website [WWW Document]. *Apparit. Squelette*. URL <http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/limites/Temps/allée/comprendre/squelette>
- Bonewald, L.F., 2013. Chapter 10 - Osteocyte Biology, in: Marcus, R., Feldman, D., Dempster, D.W., Luckey, M., Cauley, J.A. (Eds.), *Osteoporosis (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 209–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00010-8>

- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
- Brisson, B., Marquette, C., 2020. À la découverte de la bio-impression : 2 experts français répondent sur ses avancées réelles.
- Brown, W.E., 1983. A new calcium phosphate setting cement. *J Dent Res* 62, 672.
- Burmester, A., Luthringer, B., Willumeit, R., Feyerabend, F., 2014. Comparison of the reaction of bone-derived cells to enhanced MgCl<sub>2</sub>-salt concentrations. *Biomater* 4, e967616. <https://doi.org/10.4161/21592527.2014.967616>
- Burns, J.S., Rasmussen, P.L., Larsen, K.H., Schrøder, H.D., Kassem, M., 2010. Parameters in Three-Dimensional Osteospheroids of Telomerized Human Mesenchymal (Stromal) Stem Cells Grown on Osteoconductive Scaffolds That Predict In Vivo Bone-Forming Potential. *Tissue Eng. Part A* 16, 2331–2342. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0735>
- Cakmak, A.M., Unal, S., Sahin, A., Oktar, F.N., Sengor, M., Ekren, N., Gunduz, O., Kalaskar, D.M., 2020. 3D Printed Polycaprolactone/Gelatin/Bacterial Cellulose/Hydroxyapatite Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Polymers* 12. <https://doi.org/10.3390/polym12091962>
- Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D., Khademhosseini, A., 2013. Synthesis and Characterization of Hybrid Hyaluronic Acid-Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* 14, 1085–1092. <https://doi.org/10.1021/bm3019856>
- Capulli, M., Paone, R., Rucci, N., 2014. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.*, Bone: A dynamic and integrating tissue 561, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>
- Cidonio, G., Alcalá-Orozco, C.R., Lim, K.S., Glinka, M., Mutreja, I., Kim, Y.-H., Dawson, J.I., Woodfield, T.B.F., Oreffo, R.O.C., 2019. Osteogenic and angiogenic tissue formation in high fidelity nanocomposite Laponite-gelatin bioinks. *Biofabrication* 11, 035027. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab19fd>
- Comeau, P.A., Willett, T.L., 2020. Triethyleneglycol dimethacrylate addition improves the 3D-printability and construct properties of a GelMA-nHA composite system towards tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C* 112, 110937. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110937>
- Contreras-Cáceres, R., Cabeza, L., Perazzoli, G., Díaz, A., López-Romero, J.M., Melguizo, C., Prados, J., 2019. Electrospun Nanofibers: Recent Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Nanomater. Basel Switz.* 9. <https://doi.org/10.3390/nano9040656>
- Cooper, D.M.L., Matyas, J.R., Katzenberg, M.A., Hallgrímsson, B., 2004. Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif. Tissue Int.* 74, 437–447. <https://doi.org/10.1007/s00223-003-0071-z>
- Cooper, G.M., Miller, E.D., Decesare, G.E., Usas, A., Lense, E.L., Bykowski, M.R., Huard, J., Weiss, L.E., Losee, J.E., Campbell, P.G., 2010. Inkjet-based biopatterning of bone morphogenetic protein-2 to spatially control calvarial bone formation. *Tissue Eng. Part A* 16, 1749–1759. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0650>
- Cordonnier, T., Langonné, A., Corre, P., Renaud, A., Sensebé, L., Rosset, P., Layrolle, P., Sohier, J., 2014. Osteoblastic differentiation and potent osteogenicity of three-dimensional hBMSC-BCP particle constructs. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8, 364–376. <https://doi.org/10.1002/term.1529>
- Czekanska, E.M., Stoddart, M.J., Ralphs, J.R., Richards, R.G., Hayes, J.S., 2014. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 2636–2643. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34937>
- Dai, G., Lee, V., 2015. Three-dimensional bioprinting and tissue fabrication: prospects for drug discovery and regenerative medicine. *Adv. Health Care Technol.* 1, 23. <https://doi.org/10.2147/AHCT.S69191>
- De Witte, T.-M., Fratila-Apachitei, L.E., Zadpoor, A.A., Peppas, N.A., 2018. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regen. Biomater.* 5, 197–211. <https://doi.org/10.1093/rb/rby013>

- Demirtaş, T.T., Irmak, G., Gümüşderelioğlu, M., 2017. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *Biofabrication* 9, 035003. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa7b1d>
- Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang, X., Zhong, W., Xing, M., 2018. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioact. Mater.* 3, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008>
- Derby, B., 2012. Printing and Prototyping of Tissues and Scaffolds. *Science* 338, 921–926. <https://doi.org/10.1126/science.1226340>
- Dorozhkin, S.V., 2010. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 31, 1465–1485. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.050>
- El-Meliegy, E., van Noort, R., 2012. History, Market and Classification of Bioceramics, in: El-Meliegy, E., van Noort, R. (Eds.), *Glasses and Glass Ceramics for Medical Applications*. Springer, New York, NY, pp. 3–17. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1228-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1228-1_1)
- Farawati, F.A., Nakaparksin, P., 2019. What is the Optimal Material for Implant Prosthesis? *Dent. Clin. North Am.* 63, 515–530. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.02.002>
- Fedorovich, N.E., De Wijn, J.R., Verbout, A.J., Alblas, J., Dhert, W.J.A., 2008. Three-Dimensional Fiber Deposition of Cell-Laden, Viable, Patterned Constructs for Bone Tissue Printing. *Tissue Eng. Part A* 14, 127–133. <https://doi.org/10.1089/ten.a.2007.0158>
- Fenelon, M., Etchebarne, M., Siadous, R., Grémare, A., Durand, M., Sentilhes, L., Catros, S., Gindraux, F., L'Heureux, N., Fricain, J.-C., 2021. Comparison of amniotic membrane versus the induced membrane for bone regeneration in long bone segmental defects using calcium phosphate cement loaded with BMP-2. *Mater. Sci. Eng. C* 124, 112032. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112032>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Fonseca, A.C., Gil, M.H., Simões, P.N., 2014. Biodegradable poly(ester amide)s – A remarkable opportunity for the biomedical area: Review on the synthesis, characterization and applications. *Prog. Polym. Sci., Topical Issue on Biomaterials* 39, 1291–1311. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.007>
- Fricain, J.-C., Olivera, H.D., Devillard, R., Kalisky, J., Remy, M., Kériquel, V., Nihounen, D.L., Grémare, A., Guduric, V., Plaud, A., L'Heureux, N., Amédée, J., Catros, S., 2017. Impression 3D en médecine régénératrice et ingénierie tissulaire. *médecine/sciences* 33, 52–59. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301009>
- Gao, Q., Niu, X., Shao, L., Zhou, L., Lin, Z., Sun, A., Fu, J., Chen, Z., Hu, J., Liu, Y., He, Y., 2019. 3D printing of complex GelMA-based scaffolds with nanoclay. *Biofabrication* 11, 035006. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab0cf6>
- Grellier, M., Bareille, R., Bourget, C., Amédée, J., 2009. Responsiveness of human bone marrow stromal cells to shear stress. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3, 302–309. <https://doi.org/10.1002/term.166>
- Griffin, M.F., Ibrahim, A., Seifalian, A.M., Butler, P.E.M., Kalaskar, D.M., Ferretti, P., 2019. Argon plasma modification promotes adipose derived stem cells osteogenic and chondrogenic differentiation on nanocomposite polyurethane scaffolds; implications for skeletal tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 105, 110085. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110085>
- Guillemot, F., Souquet, A., Catros, S., Guillotin, B., Lopez, J., Faucon, M., Pippenger, B., Bareille, R., Rémy, M., Bellance, S., Chabassier, P., Fricain, J.C., Amédée, J., 2010. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater.* 6, 2494–2500. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.029>
- Habeeb, A.F.S.A., 1966. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 14, 328–336. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90275-2)
- Haugen, H.J., Lyngstadaas, S.P., Rossi, F., Perale, G., 2019. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J. Clin. Periodontol.* 46, 92–102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>

- Havaldar, R., Pilli, S., Putti, B., 2014. Insights into the effects of tensile and compressive loadings on human femur bone. *Adv. Biomed. Res.* 3, 101. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.129375>
- Hong, N., Yang, G.-H., Lee, J., Kim, G., 2018. 3D bioprinting and its in vivo applications. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106, 444–459. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33826>
- Hu, L., Liu, Y., Wang, S., 2018. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Dis.* 24, 696–705. <https://doi.org/10.1111/odi.12703>
- Huang, G.T.-J., Gronthos, S., Shi, S., 2009. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. *J. Dent. Res.* 88, 792–806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
- Jordana, F., Le Visage, C., Weiss, P., 2017. [Bone substitutes]. *Med. Sci.* MS 33, 60–65. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301010>
- Kalisky, J., Raso, J., Rigotherier, C., Rémy, M., Siadous, R., Bareille, R., Fricain, J.-C., Amedée-Vilamitjana, J., Oliveira, H., Devillard, R., 2016. An easy-to-use and versatile method for building cell-laden microfibres. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep33328>
- Kaur, G., Pandey, O.P., Singh, K., Homa, D., Scott, B., Pickrell, G., 2014. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 254–274. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34690>
- Keriquel, V., Guillemot, F., Arnault, I., Guillotin, B., Miraux, S., Amédée, J., Fricain, J.-C., Catros, S., 2010. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication* 2, 014101. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/1/014101>
- Khan, M.J., Gerasimidis, K., Edwards, C.A., Shaikh, M.G., 2016. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J. Obes.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7353642>
- Kozusko, S.D., Riccio, C., Goulart, M., Bumgardner, J., Jing, X.L., Konofaos, P., 2018. Chitosan as a Bone Scaffold Biomaterial. *J. Craniofac. Surg.* 29, 1788–1793. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000004909>
- Kretzschmar, N., Lipponen, S., Klar, V., Pearce, J., Ranger, T., Seppälä, J., Partanen, J., 2019. Mechanical Properties of Ultraviolet-Assisted Paste Extrusion and Postextrusion Ultraviolet-Curing of Three-Dimensional Printed Biocomposites. *3D Print. Addit. Manuf.* 6. <https://doi.org/10.1089/3dp.2018.0148>
- Kuss, M.A., Harms, R., Wu, S., Wang, Y., Untrauer, J.B., Carlson, M.A., Duan, B., 2017. Short-term hypoxic preconditioning promotes prevascularization in 3D bioprinted bone constructs with stromal vascular fraction derived cells. *RSC Adv.* 7, 29312–29320. <https://doi.org/10.1039/C7RA04372D>
- Lalande, C., 2011. Développement d'un nouveau produit d'ingénierie tissulaire osseuse à base de polymères et de cellules souche du tissu adipeux (thesis). Bordeaux 2.
- Lalande, C., Miraux, S., Derkaoui, S., Mornet, S., Bareille, R., Fricain, J., Franconi, J., Le Visage, C., Letourneur, D., Amédée, J., Bouzier-Sore, A., 2011. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* 21, 341–354. <https://doi.org/10.22203/eCM.v021a25>
- Latimer, T., 2018. Pathology of Fractures and Fracture Healing [WWW Document]. *Physiother. Sports Inj. Spec. Bike Fit Clin.* URL <https://www.physiohaus.co.uk/blog/pathology-of-fractures-and-fracture-healing> (accessed 11.6.19).
- Letourneur, D., Bordenave, L., 2017. Ingénierie tissulaire - Une approche multidisciplinaire. *médecine/sciences* 33, 46–51. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301008>
- Li, H., Daculsi, R., Grellier, M., Bareille, R., Bourget, C., Amedee, J., 2010. Role of neural-cadherin in early osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells cocultured with human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 299, C422–C430. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00562.2009>
- Lode, A., Meissner, K., Luo, Y., Sonntag, F., Glorius, S., Nies, B., Vater, C., Despang, F., Hanke, T., Gelinsky, M., 2014. Fabrication of porous scaffolds by three-dimensional plotting of a pasty

- calcium phosphate bone cement under mild conditions. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8, 682–693. <https://doi.org/10.1002/term.1563>
- Lu, R.-J., Wang, X., He, H.-X., E, L.-L., Li, Y., Zhang, G.-L., Li, C.-J., Ning, C.-Y., Liu, H.-C., 2019. Tantalum-incorporated hydroxyapatite coating on titanium implants: its mechanical and in vitro osteogenic properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 30, 111. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6308-9>
- Lu, T., Li, Y., Chen, T., 2013. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* 8, 337–350. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38635>
- Lucas, D., 2017. The Bone Marrow Microenvironment for Hematopoietic Stem Cells, in: Birbrair, A. (Ed.), *Stem Cell Microenvironments and Beyond, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 5–18. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69194-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69194-7_2)
- Martin, A., Liu, S., David, V., Li, H., Karydis, A., Feng, J.Q., Quarles, L.D., 2011. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J.* 25, 2551–2562. <https://doi.org/10.1096/fj.10-177816>
- Martin, V., Bettencourt, A., 2018. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Mater. Sci. Eng. C* 82, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.038>
- Matinfar, M., Mesgar, A.S., Mohammadi, Z., 2019. Evaluation of physicochemical, mechanical and biological properties of chitosan/carboxymethyl cellulose reinforced with multiphasic calcium phosphate whisker-like fibers for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 100, 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.015>
- McBeth, C., Lauer, J., Ottersbach, M., Campbell, J., Sharon, A., Sauer-Budge, A.F., 2017. 3D bioprinting of GelMA scaffolds triggers mineral deposition by primary human osteoblasts. *Biofabrication* 9, 015009. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa53bd>
- Mellier, C., 2011. Synthèse et caractérisation de biomatériaux phosphocalciques multiphasés dopés ou non avec des inhibiteurs de la résorption osseuse (These de doctorat). Nantes.
- Misch, C.E., Qu, Z., Bidez, M.W., 1999. Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: implications for dental implant treatment planning and surgical placement. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 57, 700–706; discussion 706-708. [https://doi.org/10.1016/s0278-2391\(99\)90437-8](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(99)90437-8)
- Moghaniyan, A., Portillo-Lara, R., Sani, E.S., Konisky, H., Bassir, S.H., Annabi, N., 2020. Synthesis and characterization of osteoinductive visible light-activated adhesive composites with antimicrobial properties. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 14, 66–81. <https://doi.org/10.1002/term.2964>
- Murphy, S.V., Atala, A., 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 32, 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H., Dixon, B., Chen, P., 2017. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* 35, 530–544. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.006>
- Nemeno-Guanzon, J.G., Lee, S., Berg, J.R., Jo, Y.H., Yeo, J.E., Nam, B.M., Koh, Y.-G., Lee, J.I., 2012. Trends in Tissue Engineering for Blood Vessels. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/956345>
- Neto, A.S., Ferreira, J.M.F., 2018. Synthetic and Marine-Derived Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* 11. <https://doi.org/10.3390/ma11091702>
- Nichol, J.W., Khademhosseini, A., 2009. Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter* 5, 1312–1319. <https://doi.org/10.1039/B814285H>
- Nichol, J.W., Koshy, S., Bae, H., Hwang, C.M., Yamanlar, S., Khademhosseini, A., 2010. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 31, 5536–5544. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.064>

- Nyberg, E., Holmes, C., Witham, T., Grayson, W.L., 2016. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering. *Drug Deliv. Transl. Res.* 6, 184–194. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0233-3>
- O’Connell, C., Ren, J., Pope, L., Li, Y., Mohandas, A., Blanchard, R., Duchi, S., Onofrillo, C., 2020. Characterizing Bioinks for Extrusion Bioprinting: Printability and Rheology, in: Crook, J.M. (Ed.), *3D Bioprinting: Principles and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer US, New York, NY, pp. 111–133. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2_7)
- Park, A., Wu, B., Griffith, L.G., 1998. Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9, 89–110. <https://doi.org/10.1163/156856298x00451>
- Pitjarnit, S., Thunsiri, K., Nakkiew, W., Wongwichai, T., Pothacharoen, P., Wattanutchariya, W., 2020. The Possibility of Interlocking Nail Fabrication from FFF 3D Printing PLA/PCL/HA Composites Coated by Local Silk Fibroin for Canine Bone Fracture Treatment. *Materials* 13, 1564. <https://doi.org/10.3390/ma13071564>
- Pourjavadi, A., Soleyman, R., 2011. Silver nanoparticles with gelatin nanoshells: Photochemical facile green synthesis and their antimicrobial activity. *J. Nanoparticle Res.* 13, 4647–4658. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0428-6>
- Qasim, M., Chae, D.S., Lee, N.Y., 2019. Bioengineering Strategies for Bone and Cartilage Tissue Regeneration Using Growth Factors and Stem Cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36817>
- Raja, N., Yun, H., 2016. A simultaneous 3D printing process for the fabrication of bioceramic and cell-laden hydrogel core/shell scaffolds with potential application in bone tissue regeneration. *J. Mater. Chem. B* 4, 4707–4716. <https://doi.org/10.1039/C6TB00849F>
- Ramesh, N., Moratti, S.C., Dias, G.J., 2018. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106, 2046–2057. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33950>
- Rouwkema, J., Rivron, N.C., van Blitterswijk, C.A., 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 26, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.009>
- Saidak, Z., Marie, P.J., 2012. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacol. Ther.* 136, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.009>
- Saijo, H., Igawa, K., Kanno, Y., Mori, Y., Kondo, K., Shimizu, K., Suzuki, S., Chikazu, D., Iino, M., Anzai, M., Sasaki, N., Chung, U.I., Takato, T., 2009. Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. *J. Artif. Organs* 12, 200–205. <https://doi.org/10.1007/s10047-009-0462-7>
- Schuurman, W., Levett, P.A., Pot, M.W., van Weeren, P.R., Dhert, W.J.A., Hutmacher, D.W., Melchels, F.P.W., Klein, T.J., Malda, J., 2013. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol. Biosci.* 13, 551–561. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200471>
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y., Shi, S., 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet* 364, 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
- Shi, Z., Huang, X., Cai, Y., Tang, R., Yang, D., 2009. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomater.* 5, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.023>
- Smith, D.M., Cray, J.J., Weiss, L.E., Dai Fei, E.K., Shakir, S., Rottgers, S.A., Losee, J.E., Campbell, P.G., Cooper, G.M., 2012. Precise control of osteogenesis for craniofacial defect repair: the role of direct osteoprogenitor contact in BMP-2-based bioprinting. *Ann. Plast. Surg.* 69, 485–488. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31824cfe64>
- Spagnuolo, G., Codispoti, B., Marrelli, M., Rengo, C., Rengo, S., Tatullo, M., 2018. Commitment of Oral-Derived Stem Cells in Dental and Maxillofacial Applications. *Dent. J.* 6. <https://doi.org/10.3390/dj6040072>

- Stammeier, J.A., Purgstaller, B., Hippler, D., Mavromatis, V., Dietzel, M., 2018. In-situ Raman spectroscopy of amorphous calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite transformation. *MethodsX* 5, 1241–1250. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.09.015>
- Sun, M., Sun, X., Wang, Z., Guo, S., Yu, G., Yang, H., 2018. Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue. *Polymers* 10. <https://doi.org/10.3390/polym10111290>
- Thayer, P., Martinez, H., Gatenholm, E., 2020. History and Trends of 3D Bioprinting, in: Crook, J.M. (Ed.), *3D Bioprinting: Principles and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer US, New York, NY, pp. 3–18. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2_1)
- Thébaud, N.B., Aussel, A., Siadous, R., Toutain, J., Bareille, R., Montembault, A., David, L., Bordenave, L., 2015. Labeling and qualification of endothelial progenitor cells for tracking in tissue engineering: An in vitro study. *Int. J. Artif. Organs* 38, 224–232. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000405>
- Thrivikraman, G., Athirasala, A., Twohig, C., Boda, S.K., Bertassoni, L.E., 2017. Biomaterials For Craniofacial Bone Regeneration. *Dent. Clin. North Am.* 61, 835–856. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.003>
- Uda, Y., Azab, E., Sun, N., Shi, C., Pajevic, P.D., 2017. Osteocyte Mechanobiology. *Curr. Osteoporos. Rep.* 15, 318–325. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0373-0>
- Van Den Bulcke, A.I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E.H., Cornelissen, M., Berghmans, H., 2000. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* 1, 31–38. <https://doi.org/10.1021/bm990017d>
- Wang, Z., Tian, Z., Menard, F., Kim, K., 2017. Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. *Biofabrication* 9, 044101. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa83cf>
- Yousefi, A.-M., 2019. A review of calcium phosphate cements and acrylic bone cements as injectable materials for bone repair and implant fixation. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 17, 2280800019872594. <https://doi.org/10.1177/2280800019872594>
- Yue, K., Santiago, G.T., Alvarez, M.M., Tamayol, A., Annabi, N., Khademhosseini, A., 2015. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* 73, 254–271. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045>
- Zhai, X., Ruan, C., Ma, Y., Cheng, D., Wu, M., Liu, W., Zhao, X., Pan, H., Lu, W.W., 2018. 3D-Bioprinted Osteoblast-Laden Nanocomposite Hydrogel Constructs with Induced Microenvironments Promote Cell Viability, Differentiation, and Osteogenesis both In Vitro and In Vivo. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurt. Ger.* 5, 1700550. <https://doi.org/10.1002/adv.201700550>
- Zhang, J., Allardyce, B.J., Rajkhowa, R., Kalita, S., Dilley, R.J., Wang, X., Liu, X., 2019. Silk particles, microfibrils and nanofibrils: A comparative study of their functions in 3D printing hydrogel scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 103, 109784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109784>
- Zhang, J.T., Tancret, F., Bouler, J.M., 2012. Mechanical Properties of Calcium Phosphate Cements (CPC) for Bone Substitution: Influence of Fabrication and Microstructure. *Key Eng. Mater.* 493–494, 409–414. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.409>
- Zhang, S., Dong, Y., Chen, M., Xu, Y., Ping, J., Chen, W., Liang, W., 2020. Recent developments in strontium-based biocomposites for bone regeneration. *J. Artif. Organs Off. J. Jpn. Soc. Artif. Organs.* <https://doi.org/10.1007/s10047-020-01159-y>
- Zhang, T., Yan, K.C., Ouyang, L., Sun, W., 2013. Mechanical characterization of bioprinted in vitro soft tissue models. *Biofabrication* 5, 045010. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/4/045010>
- Zhao, X., Lang, Q., Yildirim, L., Lin, Z.Y. (William), Cui, W., Annabi, N., Ng, K.W., Dokmeci, M.R., Ghaemmaghami, A.M., Khademhosseini, A., 2016. Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* 5, 108–118. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500005>
- Zheng, J., Wu, F., Li, H., Liu, M., 2019. Preparation of bioactive hydroxyapatite@halloysite and its effect on MC3T3-E1 osteogenic differentiation of chitosan film. *Mater. Sci. Eng. C* 105, 110072. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110072>

Zuo, Y., Liu, X., Wei, D., Sun, J., Xiao, W., Zhao, H., Guo, L., Wei, Q., Fan, H., Zhang, X., 2015. Photo-cross-linkable methacrylated gelatin and hydroxyapatite hybrid hydrogel for modularly engineering biomimetic osteon. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 10386–10394. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01433>

---

# ANNEXES

---

## Annexe 1 : Protocole de synthèse de la gélatine méthacrylée

### Matériel :

- Gélatine de peau de porc (ref Sigma/Merck : G2500-500G)
- Methacrylic anhydre (ref Sigma/Merck : 276685-100mL)
- Tube de dialyse en membrane de cellulose (ref Sigma/Merck : D9527-100FT)
- PBS 1X
- Acétone
- Eau MilliQ
- Eau Osmosée
- 2 Bechers de 5000mL opaques
- Un agitateur chauffant
- Une balance
- 2 flacons de 2,5L
- 1 flacon de 2L
- 4 clampes en plastique<sup>9</sup>

### Protocole :

Pour chaque synthèse de gélatine méthacrylée nous préparons un batch de 400mL

#### Jour 1 :

- 1-Préparer une solution de gélatine à une concentration de 100mg/mL dans du PBS dans flacon de 2,5L  
*Pour 400mL, peser 40g de gélatine et mélanger à 400mL de PBS 1X et laisser dissoudre 1H à 60°C.*
- 2-Laisser la gélatine refroidir à 50°C et laisser équilibrer à cette température durant 10min.
- 3-Mettre 1,5L d'Acétone à refroidir à -20°C
- 4-Mettre la membrane de dialyse à incuber dans de l'eau MilliQ (1,2 mètre de membrane pour 200mL de gélatine) dans un bécher de 5000mL
- 5-Ajouter sous agitation et goutte à goutte 140µL de Méthacrylate Anhydre par gramme de gélatine.  
*Pour 40g de gélatine ajouter 5,76mL de méthacrylate anhydre.*
- 6-Laisser Agiter 4H à 50°C dans l'obscurité.
- 7-Diluer la gélatine méthacrylée à 50mg/mL avec du PBS 1X : Ajouter 400mL de PBS
- 8-Mélanger avec un agitateur magnétique et laisser refroidir à 40°C
- 9-Ajouter l'acétone glaciale doucement et de façon régulière afin de remplir le flacon de 2,5L. Il se forme alors deux phases (une claire en bas et une opaque en haut).
- 10- Exécuter un mélange par rotation en faisant des à-coups énergiques une dizaine de fois.

A cette étape du protocole, il se forme un dépôt blanchâtre sur la paroi du flacon à l'interface des deux phases dont l'aspect et la texture rappellent de la mozzarella.

- 11-Décoller à l'aide d'une spatule les dépôts collés à la paroi.
- 12-Décantier le liquide dans une bouteille intermédiaire afin de ne pas perdre du dépôt, puis éliminer le liquide dans le bidon des déchets solvants.
- 13-Mettre le flacon contenant la « mozzarella » dans une cloche à vide 2 fois 5 min pour éliminer l'excédent de solvant de l'aggloméra. Éliminer ce liquide.
- 14-Solubiliser la « mozzarella » à 100mg/mL dans du PBS1X.  
Dans le cadre de notre batch, ajouter 400mL de PBS 1x.
- 15-Laisser dissoudre 1H à 60°C en mélangeant régulièrement.
- 16-Vider le bécher de 5000mL contenant les membranes et l'eau MilliQ.
- 17-Replier un bout de la membrane sur lui-même et clamper. Transvaser 200mL de gélatine encore chaude dans la membrane à l'aide d'un entonnoir. Faire descendre la gélatine jusqu'au bout de la membrane. Replier l'autre extrémité et clamper la.
- 18-Remplir d'eau osmosée.
- 19-Couvrir d'aluminium et mettre à 4°C à la chambre froide.

#### Jour 2 à Jour 5 :

- 20-Changer l'eau matin et soir avec de l'eau osmosée
- 21-A jour 2, couper le boudin de gélatine en pressant avec les doigts pour faire des sections rentrant dans des falcons de 50mL.
- 22-A jour 5, transvaser la gélatine dans des falcons 50mL (une vingtaine environ)
- 23-Congeler les tubes de gélatine 1h à -80°C
- 24-Lyophiliser les tubes de gélatine pendant 5 jours environ.

## **Annexe 2 : Protocole de synthèse des particules d'hydroxyapatite**

Pour produire 10 g d'HAp (quantité théorique) : Rapport Ca/P = 1,67

1- Préparer les solutions suivantes :

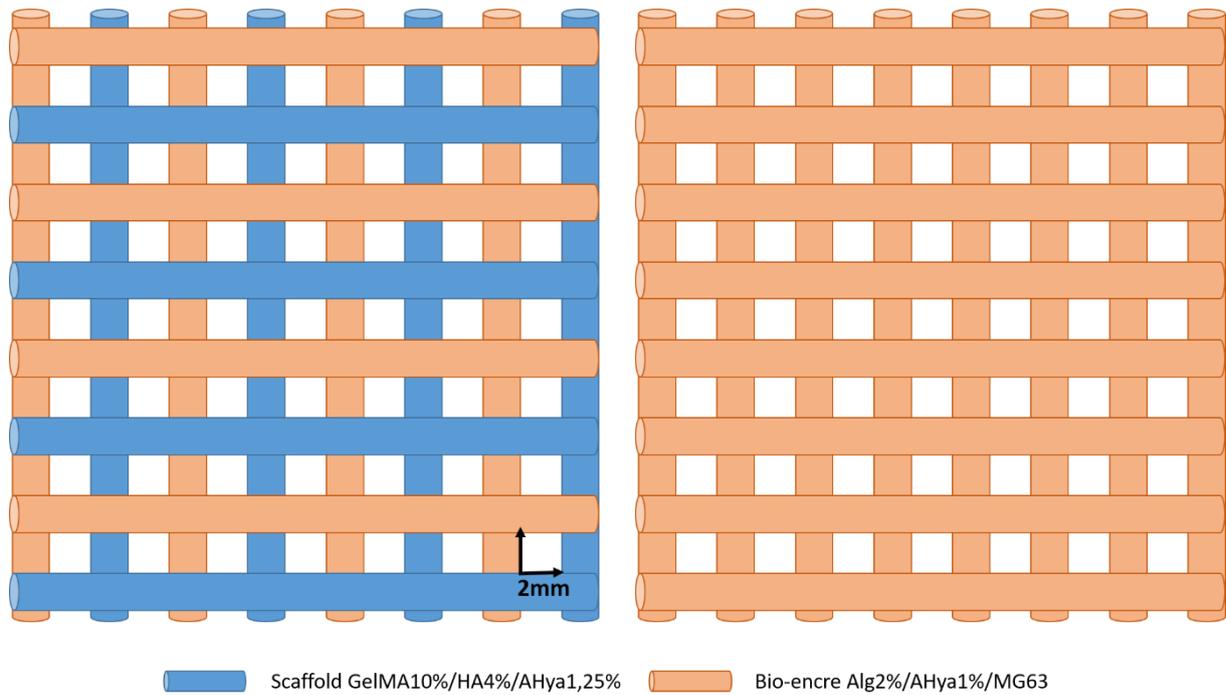
Solution de CaCl <sub>2</sub>	Solution Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0.1 mol de CaCl <sub>2</sub> 35 mL d'eau MilliQ	0.06 mol de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 150mL d'eau MilliQ

- 2- Verser goutte à goutte la solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dans celle de CaCl<sub>2</sub> à une vitesse de 20 mL/min sous agitation à 37°C.
- 3- Corriger le pH à 8
- 4- Laisser sous agitation pendant 24H à 37°C.
- 5- Laisser décanter la solution et éliminer le surnageant.
- 6- Laver la pâte phosphocalcique avec de l'eau MilliQ.
- 7- Laisser décanter la solution et éliminer le surnageant.
- 8- Reprendre la pâte avec un peu d'eau et répartir la pâte dans des falcons 50.

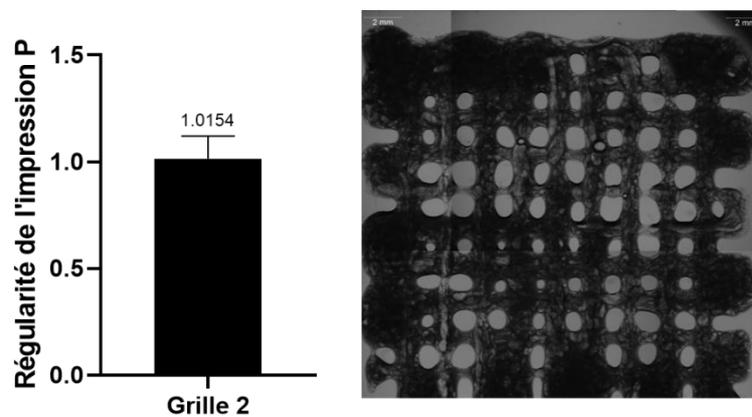
9- Centrifuger 5min à 4000 tr/min. Décanter le surnageant.

10- Sécher à l'étuve 4 jours.

### Annexe 3 : Schémas du modèle de co-impression et de d'impression de la bio-encre.



### Annexe 4 : Résultat du calcul de la régularité d'impression pour la grille N°2.



## « Fabrication par impression 3D d'un matériau composite associant un phosphate de calcium et des cellules humaines pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse. »

Robin Siadous

*Date de soutenance : Mercredi 7 Juillet 2021*

### Résumé

L'approche classique de l'ingénierie du tissu osseux vise à concevoir un substitut tissulaire associant des cellules ostéoprogénitrices à une matrice tridimensionnelle phosphocalcique capable de promouvoir la reconstruction osseuse. Le développement de l'impression 3D dans le domaine de la recherche en biomédical et plus particulièrement dans le domaine de la reconstruction osseuse a permis ces vingt dernières années, d'envisager de nouvelles solutions technologiques visant à améliorer les lacunes bien identifiées de l'approche classique : absence de hiérarchisation cellulaire, néovascularisation limitée, faible diffusion des nutriments et de l'oxygène.

Malheureusement, les matériaux commerciaux disponibles pour l'impression 3D du tissu osseux sont peu développés et ne présentent pas à la fois une bonne biocompatibilité cellulaire et à la fois des propriétés mécaniques proches de celle du tissu osseux.

L'objectif principal de ce travail a consisté à évaluer *in vitro* la faisabilité d'une co-impression d'un matériau phosphocalcique constituant l'ossature de la construction (scaffold) et d'une encre biologique. L'objectif secondaire de ce travail était le développement d'un matériau phosphocalcique imprimable et biocompatible.

Pour répondre à ces problématiques, nous proposons de développer un matériau phosphocalcique à base de gélatine méthacrylée avec une synthèse d'hydroxyapatite directement dans la gélatine. Cette approche permet d'obtenir un matériau photopolymérisable post impression ayant une phase minérale répartie de façon homogène dans le matériau évitant ainsi l'obstruction de la seringue d'impression. L'encre cellulaire est composée de cellules MG63 issues d'un ostéosarcome humain associé à un hydrogel vecteur composé d'alginate et d'acide hyaluronique. Ce modèle cellulaire simple et bien décrit *in vitro* permet de répondre aux demandes de l'impression 3D qui nécessite un volume cellulaire important.

Nos résultats montrent qu'il est possible d'imprimer sur la même imprimante, par extrusion, ce matériau avec une encre cellulaire composée de cellules MG63. Cette co-impression permet d'obtenir de façon organisée, une construction composée d'une part d'un matériau phosphocalcique recréant le micro-environnement mécanique et chimique de l'os, et d'autre part d'une encre cellulaire préservant la viabilité cellulaire lors de l'impression. De plus, les résultats des tests d'ostéodifférenciation semblent suggérer un potentiel ostéo-inducteur du matériau scaffold qui serait pertinent de confirmer avec un modèle cellulaire plus proche de la cellule ostéoblastique primaire.

**Mots clés :** Ingénierie tissulaire, Impression 3D, Biomatériaux, tissus osseux, gélatine méthacrylée, hydroxyapatite,