N° d'ordre : 4108

THÈSE

PRÉSENTÉE À

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Sylvain CATROS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : GÉNIE DES PROCÉDÉS

Etude de la Micro-Impression d'Eléments Biologiques par Laser pour l'Ingénierie du Tissu Osseux

Directeurs de recherche : Dr Fabien Guillemot; Pr Jean-Christophe FRICAIN

Soutenue le : 22 Novembre 2010

Devant la commission d'examen formée de :

M. GUILLEMOT Fabien	Docteur	Université de Bordeaux II	Directeur
M. FRICAIN Jean-Christophe	Professeur	Université de Bordeaux II	Directeur
M. DARD Michel	Professeur	Université de New York	Rapporteur
M. GIRARD Patrick	Professeur	Université de Paris VII	Rapporteur
M. JEANDOT Jacques	Professeur	Université de Bordeaux II	Membre
M. LEPETITCORPS Yann	Professeur	Université de Bordeaux I	Membre
M. LECOMMANDOUX Sébastien	Professeur	Université de Bordeaux I	Membre

Université Bordeaux 1
Les Sciences et les Techniques au service de l'Homme et de l'environnement

“All the lives we could live, all the people we will never know, never will be, they are everywhere. That is what the world is“

Aleksandar Hemon
The Lazarus Project

Merci

À Corinne et Alice;

À mes parents, ma famille et mes amis;

À mes directeurs:

Jean-Christophe Fricain pour son soutien, ses critiques constructives et son accompagnement depuis le début de mes aventures Bordelaises;

Fabien Guillemot pour m'avoir fait confiance dès le début de ce projet, pour m'avoir guidé dans la réalisation de ce travail et pour avoir su être plus têtu que moi;

A mes rapporteurs:
Michel Dard pour ses critiques éclairées et pour avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse (une seconde fois);

Patrick Girard qui m'a fait l'honneur de rapporter et de juger mon travail malgré ses nombreuses autres activités;

À Jacques Jeandot, Président du Jury, pour avoir accepté de faire partie de ce jury, mais aussi pour enseignement clinique et sa confiance;

A Sébastien Lecommandoux et Yann Lepetitcorps qui ont bien voulu prendre du temps pour juger ce travail;

À Joëlle Amédée qui m'a accueilli dans le laboratoire Inserm U577 et qui m'a permis de mener ce travail à bien;

À tout le personnel chercheurs, ingénieurs, techniciens, personnel IATOS et étudiants du laboratoire pour leurs conseils et leur soutien technique;

Aux services et laboratoires qui m'ont accueilli pour certaines expérimentations:

- ***Animalerie A2, Université Bordeaux 2 (Benoit Rousseau)***
- ***Animalerie Conventionnelle, Université Bordeaux 2 (Franck Simonnet)***
- ***Service d'Anatomo-Pathologie, CHU de Bordeaux (Colette Deminière)***
- ***Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB), Université Bordeaux 1 (Bernard Desbats)***
- ***Insitut de Chimie de la Matière Condensée (ICMCB), Université Bordeaux 1 (Eric Lebraud)***
- ***Centre de Ressources en Microscopie Electronique et Microanalyse (CREMEM), Université Bordeaux 1 (Elisabeth Sellier)***
- ***Service Commun de Microscopie Electronique (SERCOMI), Université Bordeaux 2***
- ***Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP), Université Bordeaux 1 (Jean-Paul Salvetat)***

- ***Plateforme d'Imagerie de Bordeaux 2 (BIC)***

À Anand Nandakumar, Lorenzo Moroni et Clemens van Blitterswijk (Université de Twente, Pays-Bas) qui nous ont fourni des matériaux

Plusieurs institutions et associations ont apporté un soutien financier à ce travail:

- ***L'Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO)***
- ***La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)***
- ***La Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés (SFBTM)***
- ***La Société Française du Génie Biologique et Médical (SFGBM)***
- ***La Société Francophone de Médecine Buccale et de Chirurgie Buccale (SFMbCb)***
- ***La Région Aquitaine***
- ***Le Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) « Advanced Materials in Aquitaine »***

Table des matières

AVANT PROPOS....11
INTRODUCTION....13
1.L'Ingénierie Tissulaire....13
1.1.Définition et concept général....13
1.2.Champs d'application actuels et limites de l'ingénierie tissulaire « basée sur le scaffold »....15
1.3.Les Applications cliniques de l'ingénierie tissulaire osseuse conventionnelle en chirurgie buccale et maxillo-faciale....16
a)Contexte....16
b)Méthodologie de la recherche bibliographique....16
c)Critères d'inclusion et critères d'exclusion....16
d)Analyse des articles retenus....17
e)Discussion de l'étude bibliographique....21
f)Conclusion de l'analyse bibliographique....25
2.La « Bio-fabrication »:....27
2.1.Historique et Concepts....27
2.2.Méthodes pour organiser le scaffold: Prototypage rapide....28
a) Stéréolithographie (SLA)....28
b)Frittage Sélectif par Laser (Selective Laser Sintering: SLS)....29
c)Impression en 3 dimensions (Three-dimensional Printing: 3DP)....29
d)Méthodes basées sur l'extrusion de matériau en phase plastique....30
e)Filage de membranes sous l'effet d'un champ électrique (Electrospinning)....31
f)Combinaison de méthodes....32
2.3.Le Bioprinting et l'Organ Printing....32
a)Définitions....32
b)Les imprimantes à jet d'encre....33
c)Les Micro-Seringues....35
d)La Microimpression d'éléments biologiques Assistée par Laser 36
3.La Microimpression d'éléments biologiques Assistée par Laser (LAB)....37
3.1.Principe général....37
3.2.Principe physique de l'éjection des gouttes par LAB....37
3.3.Applications du LAB pour l'ingénierie tissulaire....41
a)Impression de Cellules....41
b)Impression d'autres éléments biologiques....43
4.Objectifs de la thèse....45
MATERIEL ET METHODES....47
1.Montage expérimental pour la Micro-impression d'éléments biologiques par laser (LAB): Station de travail LASIT....48
1.1.Source Laser, Focalisation et Scanners....48
1.2.Carrousel et Platines Motorisées....48
1.3.Interface informatique....49
1.4.Préparation des lames donneuses (« Ribbon »)....51
a)Dépôt de la couche métallique absorbante....51
b)Stérilisation et nettoyage des lames donneuses....52
c)Étalement de l'encre cellulaire sur la lame donneuse....52
d)Conditions d'impression....52
1.5.Préparation des lames « receveuses » (Substrate)....52
a)Verre....52
b)Matrigel®....53

Présentation et dilution....53
Etalement du Matrigel sur les lames receveuses....53
c)Agarose....53
d)Membranes de Polycaprolactone (PCL) préparés par « électrospinning »....53
2.Préparation d'une encre d'hydroxyapatite nano-cristalline....54
2.1.Synthèse de nHA par précipitation humide....54
2.2.Caractérisations Morphologiques, Structurales et Physico-Chimiques....54
a)Microscopie Electronique à Balayage (MEB)....54
b)Microscopie Electronique à Transmission (MET)....54
c)Diffaction des Rayons X (DRX)....54
d)Spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)....55
2.3.Evaluation de la biocompatibilité de la nHA....55
2.4.Préparation de l'encre de nHA....55
3.Préparation d'encres de cellules....56
3.1.Culture Cellulaire....56
a)MG63....56
b)Ea hy926....56
c)Cellules Ostéoprogénitrices humaines: Human Osteo Progenitors (HOPs)....56
d)Cellules mésenchymateuses issues de tissu adipeux: Adipose Derived Stromal Cells (ADSC)....56
3.2.Préparation de l'Encre de cellules....56
a)Ajustement de la concentration cellulaire....56
b)Supplémentation de la solution par de l'alginate....57
c)Antibiotiques....57
4.Méthodes de Caractérisation en Biologie....58
4.1.Méthodes de coloration et de marquage des cellules....58
a)Coloration au Live/Dead....58
b)Coloration des noyaux cellulaires au Hoechst....58
c)Test au MTT....58
d)Marquage de la Phosphatase Alcaline....58
e)Immuno-marquage de l'Ostéocalcine dans les cellules....59
4.2.Microscopie Optique....59
4.3.Observation au photon imageur des cellules transfectées par la luciférase....59
5.Méthodes Chirurgicales et évaluation de la reconstruction tissulaire in vivo....61
5.1.Défaut osseux critique sur la calvaria de souris....61
a)Animaux....61
b)Anesthésies....61
c)Défauts osseux latéraux ou défaut central....61
d)Implantation et sutures....62
e)Sacrifice....62
5.2.Implantations sous cutanée de cellules....62
a)Animaux et cellules....62
b)Suivi des cellules implantées en sous-cutané....62
5.3.Histologie....63
a)Prélèvement et fixation....63
b)Histologie en paraffine (échantillons non calcifiés ou décalcifiés)....63
c)Histologie en résine (échantillons non décalcifiés)....63
d)Observation et Acquisition des images....63
5.4.Micro-scanner....63
a)Acquisition....64
b)Reconstructions et quantification de la surface minéralisée....64

c)Analyses statistiques....64
RÉSULTATS....65
A: Impressions en 2 Dimensions....66
1.Impressions d'hydroxyapatite en 2D....66
1.1.Synthèse et caractérisation de l'hydroxyapatite nanocristalline....66
1.2.Détermination des conditions d'impression de l'encre de nHA....69
2.Détermination des conditions d'impressions des cellules....72
2.1.Viabilité et Phénotype des HOPs imprimées sur Matrigel® ou nHA....72
2.2.Influence de 3 paramètres d'impression sur la viabilité des cellules Ea-hy926 imprimées....73
2.3.Viabilité des autres types cellulaires utilisés....75
3.Impressions «multicouleurs»....79
3.1.nHA + HOPs....79
3.2.nHA + MG63....80
3.3.ADSC-GFP et ADSC-Tomato....80
3.4.Cercles concentriques de cellules Ea-hy926....81
B: Impressions en 3 Dimensions....82
1.Expérimentations in vitro :....82
1.1.Superposition de couches d'hydroxyapatite....82
1.2.Impressions de cellules sur des membranes de PCL tissées par électrospinning....83
2.Implantations in vivo de matériaux fabriqués par LAB....86
2.1.Etude Préliminaire: Evaluation de la prolifération sous cutanée de MG63-Luc et d'ADSC-Luc chez la souris NOG....86
2.2.Implantation de matériaux cellularisés par LAB en site pariétal chez la souris....90
3.Impressions in vivo et in situ....97
3.1.Impression in vivo de nHA chez la souris C57-Black....97
3.2.Impression in vivo de MG63 chez la souris “nude“....101
....104
DISCUSSION....105
1.Sur la préparation et l'impression de l'encre de nHA par LAB....107
2.Sur la préparation et impression d'encres de cellules par LAB....109
3.Sur la fabrication et l'implantation de matériaux tridimensionnels PCL-Cellules....113
4.Sur l'impression in vivo et in situ par LAB....116
5.Sur la station de travail « LASIT » pour le LAB....119
CONCLUSIONS....123
BIBLIOGRAPHIE....125
INDEX DES TABLES ET DES ILLUSTRATIONS....141
....146
ANNEXES....147
1.Préparation de membranes de polycaprolactone (PCL) par electrospinning....147
2.Micro-IRM....147
3.Isolation de Cellules HOP....147
4.Isolation de Cellules ADSC....148
5.Transfection des cellules pour le suivi par photon imageur....148
COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS....149
1.Communications orales....149
2.Communications affichées....150
3.Publications....151
4.Actes de Congrès....152
5.Chapitre d'ouvrage....152
6.Brevet....152

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé entre Septembre 2007 et Septembre 2010 dans le laboratoire INSERM U577 intitulé “Biomatériaux et Réparation Tissulaire“ à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2. Un des thèmes de recherche du laboratoire est l'étude de la réparation et de la régénération du tissu osseux, depuis l'ostéoblaste et ses rapports avec les cellules endothéliales, jusqu'à la reconstruction osseuse chez l'homme en chirurgie maxillo-faciale ou orthopédique.

Le contexte de cette étude est l'ingénierie du tissu osseux, c'est à dire l'application des méthodes issues des sciences de la vie, de l'ingénieur, mais aussi de la physique ou de la chimie, pour le maintien ou le remplacement de la structure et des fonctions des tissus.

Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à une approche nouvelle dans la reconstruction tissulaire qui consiste à organiser les différents éléments du tissu ou de l'organe par des techniques de micro-impression d'éléments biologiques. En effet, les méthodes conventionnelles de prise en charge des pertes de substance osseuses ne sont pas toujours efficaces et les cliniciens se heurtent à un certain nombre de complications et d'échecs.

Une station de travail pour la micro-impression d'éléments biologiques par laser a été développée au laboratoire afin d'étudier les intérêts de cette nouvelle approche pour la reconstruction tissulaire. L'objectif général de la thèse était d'évaluer l'intérêt de la micro-impression d'éléments biologiques assistée par laser pour l'ingénierie du tissu osseux.

INTRODUCTION

1. L'INGÉNIERIE TISSULAIRE

1.1. Définition et concept général

Le remplacement de tissus ou d'organes entiers défaillants représente un champ important de la chirurgie actuelle. Les méthodes courantes comprennent les lambeaux et les greffes de tissus autologues, les greffes de tissus de donneurs et l'utilisation de biomatériaux. Le tissu autologue représente un matériau « idéal », malheureusement il n'est disponible qu'en quantité limitée et le site donneur peut être fragilisé lors des prélèvements. Les tissus de donneurs humains ou animaux posent des problèmes de compatibilité HLA pour les donneurs vivants et des risques infectieux pour les tissus prélevés sur des cadavres. De plus, les hétérogreffes et les xénogreffes ne permettent pas d'apporter la composante cellulaire et les facteurs de croissance nécessaires à la régénération tissulaire. Les biomatériaux ont été développés pour se substituer aux greffes avec une vision de remplacement d'organes à plus long terme.

Le tournant conceptuel de l'ingénierie tissulaire est lié à l'interdisciplinarité qui la définit: il s'agit « d'appliquer les principes des sciences de la vie et de l'ingénierie pour développer des substituts tissulaires pour remplacer, maintenir ou améliorer le fonctionnement d'un tissu ou d'un organe entier » (1). Les moyens utilisés par l'ingénierie tissulaire sont très variés et comprennent la physique, les mathématiques, l'informatique, la biologie, la médecine ou encore la robotique. Le principal objectif de l'ingénierie tissulaire est le développement d'organes de remplacement mais il peut aussi s'agir de mettre au point des modèles d'étude en 2 ou 3 dimensions pour la biologie (2). Toutes ces méthodes visent à reproduire dans le tissu artificiel le micro-environnement spécifique à chaque tissu avec des cellules, des facteurs de croissance et une matrice organique ou inorganique (Figure 1).

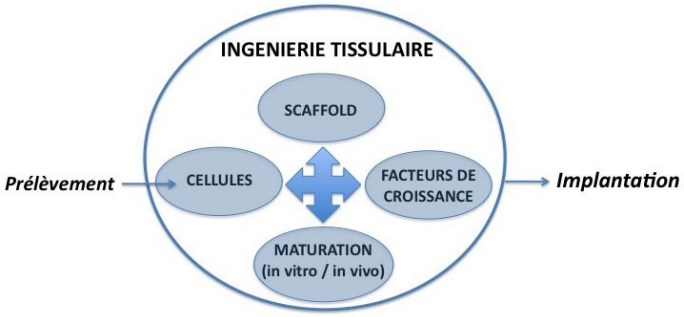


Figure 1: Schéma du principe général de l'ingénierie tissulaire: Après prélèvement, les cellules autologues sont amplifiées, différenciées et ensemencées sur un matériau macroporeux (scaffold) en présence de facteurs de croissance. Une phase de maturation in vitro ou in vivo est parfois utilisée avant l'implantation du néo-tissu chez le patient.

Les étapes traditionnelles de l'ingénierie tissulaire comprennent tout d'abord le prélèvement de cellules chez le patient puis leur mise en culture avec éventuellement une étape de différenciation. Ensuite les cellules sont ensemencées sur un matériau poreux biodégradable (scaffold = échafaudage) dont les propriétés sont choisies en fonction du tissu à

reconstruire. La culture des cellules sur l'échafaudage se fera préférentiellement dans des conditions dynamiques (bioréacteur) afin de favoriser la pénétration des nutriments et les échanges gazeux au sein du biomatériau (3). A cette étape, des facteurs de croissance et de différenciation peuvent être utilisés pour favoriser la croissance tissulaire. Enfin, après un temps de maturation suffisant, le tissu peut être réimplanté sur le patient (Figure 1). On parle donc d'ingénierie tissulaire « basée sur le scaffold » puisque ce dernier a une place centrale dans la construction du substitut tissulaire par ingénierie tissulaire (4).

Le scaffold a plusieurs rôles bien définis dans l'ingénierie tissulaire conventionnelle (1,5,6):

- Il doit permettre l'adhésion et la prolifération cellulaire sur un substrat solide, ce qui semble être un environnement favorable à la fonction cellulaire;
- Il doit reproduire la forme spécifique de l'organe et maintenir cette forme dans le temps;
- Il peut être un vecteur de facteurs de migration, prolifération et différenciation pour les cellules souches environnantes;
- La structure poreuse des scaffolds solides doit permettre l'ensemencement cellulaire et la mise en place d'une vascularisation (7);
- Ses propriétés mécaniques doivent être suffisantes pour supporter la fonction du tissu. De plus, la résorption du scaffold doit se faire en parallèle avec la reconstruction tissulaire pour maintenir les propriétés mécaniques du tissu.

De nombreux types cellulaires sont employés en ingénierie tissulaire. Tout d'abord, des lignées cancéreuses ou simplement immortalisées sont couramment utilisées pour la mise au point des matériaux et le développement de modèles de culture. L'intérêt de ces lignées est tout d'abord qu'elles sont très homogènes, ce qui permet de s'affranchir d'une variabilité liée aux cellules dans les expérimentations. Ensuite, ces lignées sont faciles à obtenir en grande quantité, ce qui est un avantage certain en ingénierie tissulaire. Cependant, ces cellules ne peuvent pas être utilisées chez l'homme dans une optique de régénération de tissus. Ainsi, les résultats obtenus avec des lignées doivent toujours être confirmés avec des cellules humaines primaires. Les cellules primaires utilisées en ingénierie tissulaire sont systématiquement des cellules souches différenciées prélevées sur des patients. Ces cellules souches sont pluripotentes et leur phénotype peut être orienté vers différentes lignées cellulaires. Ainsi, les cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux peuvent être différenciées en ostéoblastes ou en chondroblastes (8). De plus, les cellules autologues peuvent être réimplantées chez le patient source sans induire de réaction immunitaire. Les limites de l'utilisation des cellules souches sont parfois l'hétérogénéité des populations cellulaires en fonction des individus, ce qui peut rendre les protocoles d'ingénierie tissulaire peu reproductibles.

Les facteurs de croissance et de différenciation cellulaires ont été utilisés pour favoriser l'intégration tissulaire des matériaux implantés. En effet, ils permettent le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules souches environnantes. Les molécules utilisées dans le tissu osseux (BMP-2 et BMP-7) ont déjà prouvé leur efficacité chez l'homme dans des indications précises (9). La principale limite à l'utilisation de ces facteurs de croissance est qu'ils pourraient entraîner une prolifération cellulaire non contrôlée si leur diffusion n'était pas limitée (10). Pour éviter cet inconvénient, des systèmes de couplage et de libération contrôlée ont ainsi été mis au point (11).

1.2. Champs d'application actuels et limites de l'ingénierie tissulaire « basée sur le scaffold »

L'ingénierie tissulaire a déjà permis de fournir des tissus artificiels utilisés en clinique chez l'homme pour la peau (12,13), les gros vaisseaux (14) ou la vessie (15). D'autres applications récentes sont en cours de mise au point sur la cornée et le myocarde avec des feuillets cellulaires (16).

Cependant, certains tissus ou organes plus complexes ne peuvent pas encore être traités par ingénierie tissulaire en raison de certaines limites inhérentes aux protocoles utilisés (5):

- L'étape d'ensemencement cellulaire *in vitro* dans les scaffolds n'est pas complètement maîtrisée. Plusieurs semaines ou plusieurs mois de maturation sont souvent nécessaires pour obtenir la cellularisation d'un matériau avant son implantation. Bien souvent, seule la partie externe du scaffold est colonisée par les cellules, ce qui limite l'efficacité de la reconstruction (17,18). Il n'est pas possible avec les méthodes conventionnelles « basées sur le scaffold » de contrôler précisément la position et la densité des cellules dans le matériau (Figure 2).
- La présence de vaisseaux est indispensable au sein des tissus et des organes artificiels afin d'apporter aux cellules les nutriments et l'oxygène et pour éliminer les déchets du métabolisme (19,20). Ainsi, à partir de quelques centaines de µm d'épaisseur, une vascularisation doit être établie pour la maturation du tissu et son intégration dans l'organisme hôte. Cette mise en place de la vascularisation n'est pas résolue actuellement pour des tissus volumineux.

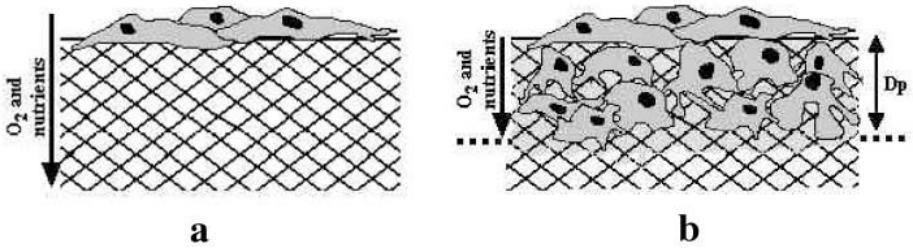


Figure 2: La limite de la colonisation cellulaire dans les matériaux macro-poreux est liée à la limite de diffusion de l'oxygène et des nutriments au sein du matériau; D'après (17)

La majorité des travaux d'ingénierie tissulaire actuels sont basés sur l'utilisation d'un scaffold solide biodégradable qui est ensemencé par des cellules avec éventuellement l'adjonction de facteurs de croissance. De nombreuses méthodes ont été décrites pour favoriser la pénétration des cellules au sein du matériau comme l'utilisation de bioréacteurs (3) ou encore la modification de l'architecture des scaffolds (21). Cependant, il apparaît que ces méthodes ne sont pas toujours efficaces et qu'il est difficile de contrôler précisément la distribution spatiale et quantitative des éléments biologiques ensemencés sur le matériau, notamment lorsque plusieurs types cellulaires et biomolécules sont utilisés dans une même structure.

A partir de ces constats, nous verrons que des méthodes automatisées de construction de scaffolds par prototypage rapide ont été décrites pour contrôler l'architecture interne des matériaux. Ensuite, le principe d'impression d'organes (« Organ Printing ») a été imaginé pour la construction tridimensionnelle de tissus avec des cellules. Plusieurs méthodes d'impression ainsi que des prototypes ont été développés pour réaliser ces matériaux organisés. La particularité de ces nouvelles approches est qu'elles utilisent les ressources de la conception et

de la fabrication assistées par ordinateur pour construire des matériaux ou des tissus couche par couche en 3 dimensions, avec des éléments biologiques et/ou biocompatibles (Page 27).

1.3. Les Applications cliniques de l'ingénierie tissulaire osseuse conventionnelle en chirurgie buccale et maxillo-faciale

Nous avons choisi dans cette introduction de faire une mise au point sur les applications de l'ingénierie tissulaire osseuse dans la sphère orale et maxillo-faciale. L'objectif était de recenser les applications actuelles chez l'homme et les méthodes employées dans chaque indication. Cela a aussi permis de mieux cerner les difficultés rencontrées dans ce domaine. Cet état de l'art a donné lieu à un article (9).

a) Contexte

L'ingénierie tissulaire (IT) a été définie comme « l'ensemble des techniques et des méthodes s'inspirant des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie, utilisées pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus » (1). Le principe général est d'associer une matrice tridimensionnelle (scaffold), avec des cellules autologues et des facteurs de croissance pour reconstruire un nouveau tissu hybride (Figure 1).

Les applications cliniques chez l'homme existent déjà pour la peau depuis les années 1990 (13). Plus récemment, des tissus produits par IT ont été développés pour les muscles squelettiques, le coeur, les gros vaisseaux ou le tissu nerveux (22). Un des objectifs de la médecine régénératrice est de développer des substituts d'organes entiers (vessie, rein, pancréas) pour faire face aux demandes croissantes de greffons.

L'IT osseuse a été développée pour palier les limites des méthodes conventionnelles de traitement des pertes de substance osseuses. Il s'agit de la morbidité induite par les autogreffes ou de l'absence d'intégration des greffes de grande étendue.

L'objectif de cette mise au point est de rechercher quelles sont les applications cliniques humaines actuelles et quel est le bénéfice de l'ingénierie tissulaire osseuse dans la sphère orale et maxillo-faciale.

b) Méthodologie de la recherche bibliographique

Les bases de données Medline et Pubmed ont été consultées sur la période 1999-2010 pour les articles en Anglais ou en Français, avec les mots clés suivants:

- Mots Clés MESH (Medical Subject Headings): "Tissue Engineering/methods" OR "Tissue Engineering/utilization" OR "Tissue Engineering/veterinary"AND "Facial Bones/surgery"OR "Facial Bones/transplantation"
- Autres mots clés utilisés: « mandible reconstruction human » / « mandible reconstruction growth factor human » / « mandible reconstruction cells human » / « sinus lift tissue engineering » / « sinus lift growth factor / BMP» / « Maxillary bone tissue engineering » / « sinus lift cells ».

Enfin une recherche manuelle sur les références des articles sélectionnés a été réalisée pour croiser les informations obtenues.
Les articles sélectionnés ont ensuite été regroupés en fonction du domaine clinique d'application.

c) Critères d'inclusion et critères d'exclusion

Les études cliniques originales ou rapports de cas utilisant un produit d'ingénierie tissulaire osseuse (PIT) avec au moins deux des quatre conditions suivantes ont été retenus

dans cette recherche bibliographique:

- Matrice organique ou inorganique
- Cellules autologues prélevées, amplifiées et induites
- Facteurs de croissance
- Maturation des PIT osseuse (*in vivo* ou *in vitro*)

En revanche, certains articles n'étaient pas retenus dans cette revue de littérature systématique:

- les revues de littérature;
- les études n'utilisant pas au moins 2 des conditions décrites précédemment;
- les études utilisant le PRP (Platelet Rich Plasma) ou le PRF (Platelet Rich Fibrin) comme facteur de croissance;
- Les études utilisant les autogreffes ou les lambeaux seuls.

d) Analyse des articles retenus

Quarante-sept articles concernant la reconstruction osseuse dans le domaine maxillofacial ont été retenus et analysés en fonction des critères définis. Trente-sept études sont des rapports de cas, 5 articles sont des études prospectives non contrôlées et 5 articles sont des études prospectives randomisées de faible puissance.

Seule l'étude de cas de Mesimäki et al. (23) associait les 4 critères d'inclusion. Dans 17 articles, trois des critères d'inclusion étaient présents (Scaffold + cellules + maturation ou Scaffold + BMP + Maturation). Dans 20 articles, 2 critères d'inclusion étaient présents (Scaffold et cellules autologues différenciées ou Scaffold et facteurs de croissance) (Tableau 1, Tableau 2,Tableau 3).

Le scaffold était utilisé dans tous les cas. Les matériaux étaient des phosphates de calcium synthétiques (11 cas), des polymères tressés (9 cas), des allogreffes (5 cas), des xénogreffes d'origine bovine (5 cas), des autogreffes (2 cas), du collagène d'origine bovine (10 cas) ou un gel de fibrine (autologue ou non: 12 cas). Dans certains cas, plusieurs scaffolds étaient utilisés. Les cellules utilisées étaient le plus souvent issues de moelle osseuse illiaque (16 cas). Elles pouvaient aussi provenir du périoste (7 cas), du tissu adipeux (2 cas) ou bien de la pulpe dentaire (1 cas). Les facteurs de croissance utilisés étaient des BMP d'origine humaine ou bovine dans les premières études (3 cas). Ensuite, les formes recombinantes ont été utilisées (rh-BMP-2: 10 cas; rh-BMP-7: 5 cas, rh-GDF: 1 cas).

Dix-neuf articles décrivaient la reconstruction de grands défauts osseux maxillaires ou mandibulaires par ingénierie tissulaire (Tableau 1). Il s'agissait toujours de cas complexes, chez des patients en échec thérapeutique avec les méthodes conventionnelles de greffes osseuse ou de lambeaux autologues. Le site receveur était souvent constitué d'un os hypovascularisé et hypocellularisé par la radiothérapie, ou infecté (ostéomyélites) (23-40) (Tableau 1).

Les scaffolds utilisés étaient des Phosphates de Calcium, des cages en titane, des éponges de collagène, de la fibrine ou des polymères (Dacron, Polycaprolactone). Dans 5 cas, des cellules mésenchymateuses indifférenciées étaient induites vers un phénotype ostéoblastique *in vitro* avant implantation et dans 5 cas des greffes osseuses ou de la moelle osseuse autologue ont été utilisées.

Les BMP ont été utilisées dans 12 cas sur 18.

La maturation du produit d'ingénierie tissulaire (PIT) a été réalisée *in vivo* dans 7 cas chez l'homme depuis le premier cas publié en 1999 (24). Quatre cas ont été réalisés à la mandibule (24-27) et un cas au maxillaire (23). Le principe était de placer l'assemblage construit par IT à proximité d'un muscle, qui est un site favorable au développement d'une vascularisation

(muscle grand dorsal (24,25,27,32), grand pectoral (26) ou grand droit de l'abdomen (23)). Cette étape a permis le dépôt de tissu osseux et la formation de néo-vaisseaux dans les matériaux implantés. Après plusieurs mois de maturation le greffon était déplacé vers son site receveur grâce à un lambeau pédiculé (1 cas) ou libre (4 cas). Dans un cas, le greffon a subi une maturation *in vitro* avant son implantation (après ensemencement des cellules sur le scaffold) (33).

Deux articles (28,41) ont présenté des cas de reconstruction mandibulaire par la technique des membranes induites de Masquelet, initialement décrite pour la reconstruction des os longs (42,43). Cette méthode a été utilisée au niveau mandibulaire pour traiter des cas d'ostéomyélites et d'ostéoradionécroses (28,38). Le principe était d'induire dans un premier temps chirurgical la formation d'une membrane synoviale autour du défaut osseux grâce à l'interposition d'une entretoise de ciment polyméthylmétacrylate, puis de combler la perte de substance par une autogreffe ou un biomatériau dans un second temps.

Référence	Type d'étude	Cause et Localisation Défect	Scaffold	Cellules	Facteurs de Croissance	Maturation	Résultats
(24)	1 cas	Améloblastome Mandibule	Dacron-Polyuréthane	Os spongieux	BMP (humaine)	*In vivo*: 4 mois Facia Dorsal	Succès partiel Survie 16 mois
(29)	1 cas	Améloblastome Mandibule	Allogreffe (Dynagraft®)	-	BMP (humaine)	-	Succès à 9 mois (Biopsie)
(30)	Etude comparative non randomisée (n=13)	Améloblastome Arme à feu Mandibule	Allogreffe (Dynagraft®)	-	BMP (bovine)	-	Succès 2 cas sur 6
(31)	1cas	Chirurgie Orthognathique Maxillaire- Mandibule	Fibrine autologue (PRP)	-	rhBMP-7	-	Succès à 1 mois (Biopsie)
(25,32)	1 cas	Carcinome épidermoïde Mandibule	Cage en Titane CAD Blocs de Bio-Oss® Granules Bio-Oss®	Moelle Osseuse	rhBMP-7	*In vivo*: 7 semaines (Muscle Grand Dorsal)	Succès précoce mais fracture cage titane 13e mois puis décès
(28)	3 cas	Ostéomyélite Fibrome cémentifiant Mandibule	Autogreffe Osseuse	Autogreffe Osseuse	Membranes induites	*In vivo*: 3 à 4 mois avec ciment méthylmétacrylate	Succès 4 cas
(26)	1 cas	Carcinome épidermoïde Mandibule	Hydroxyapatite (Pro Osteon®: Corail)	-	rhBMP-7	*In vivo*: 6,5 mois (Muscle grand pectoral)	Echec 6 mois perte du lambeau
(33)	22 cas	Kystes mandibule	Collagène bovin (Osteovit®)	HBMSC-OB	-	*In vitro*: 3-4 jours	Succès (similaire à autogreffe)
(34)	1 cas	Carcinome épidermoïde Mandibule	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	Succès après distraction (pose 6 implants)
(44)	1 cas	Fibrome Ossifiant Mandibule	Eponges de collagène (Helistat®) + HA-TCP	-	rhBMP-2	-	Succès après distraction (36 mois)
(35)	5 cas	Ostéomyélites Kyste Dentigères Mandibule	Eponges de collagène +/- Allogreffe	+/- Moelle Osseuse	rhBMP-2	-	Succès 3 cas sur 5
(36)	10 cas	Améloblastome – Ostéomyélite Mandibule	Os déminéralisé (allogreffe) (Dynagraft®)	-	rhBMP-7	-	Succès à 1 an (100%)
(37)	14 cas	Cancers Ostéomyélites Mandibule	Eponges de collagène	-	rhBMP-2	-	Succès 100%
(38)	4 cas	Ostéoradionécrose Mandibule	HA-ßTCP	Moelle Osseuse	Membranes induites	*In vivo*: 8 semaines avec ciment méthylmétacrylate	Succès 2 cas sur 4
(39)	1 cas	Péri-implantite Mandibule	Polycaprolcatone	-	rhBMP-2	-	Succès (implants à 6 mois)
(23)	1 cas	Kératokyste Maxillaire	ßTCP	ADSC-OB	rhBMP-2	*In vivo:* 8 mois (Muscle Grand droit adbominal)	Succès: implants après 4 mois
(27)	1 cas	Ostéomyélite Mandibule	ßTCP	Moelle Osseuse		*In vivo*: 6 mois (Muscle grand dorsal)	Succès à 12 mois
(40)	1 cas	Hémangiome Mandibule	Os autogène lyophilisé + Colle de Fibrine	HBMSC-OB	-	-	Succès (3 chirurgies + distraction)

Tableau 1: Chirurgie Osseuse Reconstructrice Maxillaire ou Mandibulaire

HBMSC-OB: Cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse, induites vers un phénotype ostéoblastique
ADSC-OB: Cellules mésenchymateuses issues de tissu adipeux, induites vers un phénotype ostéoblastique
PRP: Plasma Riche en Plaquettes
rhBMP-2: Bone Morphogenetic Protein 2 (recombinante)
rhBMP-7: Bone Morphogenetic Protein 7 (recombinante)
HA-TCP: Hydroxyapatite - Phosphate Tricalcique

Six rapports de cas (Tableau 2) (45-50) présentaient la reconstruction de fentes congénitales palatines ou faciales par ingénierie tissulaire. Ces auteurs ont souvent utilisé l'IT en complément de distractions osseuses (45,46,50). Les scaffolds utilisés dans les fentes étaient soit des éponges de collagène, soit de la fibrine (préparée avec du PRP), soit un phosphate de calcium. Des ostéoblastes issus de la moelle osseuse ont été ajoutés aux scaffolds dans 3 cas. Les BMPs ont été utilisées dans 1 seul cas. La maturation du PIT n'a jamais été utilisée. La reconstruction osseuse obtenue après traitement était quasi-complète ou complète, ce qui a permis l'éruption normale des dents retenues dans plusieurs cas.

Référence	Type d'étude	Objectif	Scaffold	Cellules	Facteurs de Croissance	Maturation	Résultats
(45,46)	1 cas	Reconstruction fente faciale complexe + hypoplasie mandibulaire	Eponge de collagène (Helistat®)	-	rhBMP2	-	Suivi 4,5 ans Reconstruction partielle
(50)	50 cas	Réparation fentes par rhBMP2, sans autogreffe	Eponge de collagène	-	rhBMP2	-	Succès 49/50 +/- distraction
(47)	1 cas	Reconstruction fente alvéolo-palatine	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	Régénération 79% du défaut
(48)	1 cas	Reconstruction fente alvéolo-palatine	Eponge de collagène (Ostéovit®)	HBMSC	-	3 à 4 jours	Fermeture complète fente (RX 18 mois)
(49)	2 cas	Reconstruction fente alvéolo-palatine	Os déminéralisé + Sulfate de Calcium (Osteoset ®)	HBMSC-OB	-	-	Régénération 66% et 75% du défaut

Tableau 2: Chirurgie Osseuse Reconstructrice des Fentes Faciales

HBMSC-OB: Cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse, induites vers un phénotype ostéoblastique
HBMSC: Cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse
PRP: Plasma Riche en Plaquettes
rhBMP-2: Bone Morphogenetic Protein 2 (recombinante)

Dans 22 articles, l'ingénierie tissulaire osseuse a été utilisée pour la régénération osseuse pré-implantaire et parodontale (Tableau 3) (51-73). Il s'agissait de l'élévation du plancher des sinus maxillaires (15 articles), de la régénération de défauts péri-implantaires (3 articles), d'augmentations osseuses alvéolaires verticales ou transversales (4 articles) ou du traitement de défauts osseux angulaires parodontaux (1 article).
Dans ces indications, les scaffolds utilisés étaient soit des matériaux non déformables (phosphates de calcium, xénogreffes: 9 cas), soit des hydrogels (Fibrine: 6 cas) soit des éponges (collagène, PLGA: copolymère acide polyglycolique + acide polylactique: 11 cas).
Dans 17 cas sur 21, des cellules mésenchymateuses induites vers un phénotype ostéoblastique (moelle osseuse, tissu adipeux, pulpe dentaire) ont été ensemencées dans les scaffolds.
Les BMP (rhBMP2) ont été utilisées dans 5 cas pour imprégner des scaffolds et dans un cas, le GDF-5 a été greffé de façon covalente sur un phosphate de calcium.
La maturation *in vitro* a été utilisée dans 10 cas. Dans 3 articles (51-73), un protocole commercial d'ingénierie tissulaire osseuse a été mis en oeuvre (Protocole Bioseed® et protocole Biotissue®): Il s'agissait d'un scaffold de fibres de PLGA ensemencé avec des ostéoblastes issus du périoste, et mis en maturation *in vitro pendant* 7 jours avant implantation. Les résultats étaient inconstants mais globalement positifs avec cette méthode.

Référence	Type d'étude	Objectif	Scaffold	Cellules	Facteurs de Croissance	Maturation	Résultats
(69)	Etude Prospective non contrôlée (n=12)	Sécurité et Efficacité des BMP pour ROG pré-implantaire	Éponge de Collagène	-	rhBMP2	-	Pas d'effet néfaste local ou général des BMPs Succès implantaire à 3 ans
(70)	Etude Contrôlée Randomisée (n=11, 34 implants)	Intérêt d'ajout de BMP pour ROG péri implantaire	BioOss®	-	rhBMP2	-	Augmentation volume os néoformé et diminution durée cicatrisation avec rhBMP2
(55)	2 cas	Sinus Lift par IT	Membrane Ethisorb® (Ethicon®) + Fibrine (Tissucoll®)	PDSC-OB	-	*In vitro*: 1 semaine	Succès (Rx + Biopsie) Insertion des implants à 4 mois
(56)	Etude Prospective non contrôlée (n=27)	Sinus Lift par IT	Membrane Ethisorb® (Ethicon®)	PDSC-OB	-	*In vitro*: 1 semaine	Succès 18 cas Echec 9 cas
(72)	3 cas	ROG péri implantaire par substitut IT injectable	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	Succès sur 3 cas (10 implants)
(71)	Etude Contrôlée Randomisée (n=48)	Détermination de la concentration nécessaire de rhBMP2 pour sinus lift	Éponge de Collagène (Helistat®)	-	rhBMP2	-	BMP2: 80% succès Concentration BMP2 idéale=1,5mg/ml
(57)	1 cas	Augmentation osseuse transversale mandibule	PLGA (Vicryl); Protocole Bioseed®	PDSC-OB	-	*In vitro*: 5 semaines puis greffe	Succès: pose 2 implants à 6 mois
(58)	Etude comparative non randomisée (n=13)	Sinus Lift	Xenogreffe (BioOss®) Eponge de collagène (Lyostypt®)	HBMSC-OB PDSC-OB	-	*In vitro*: 7 à 40 jours	IT supérieure à autogreffe
(65)	Etude comparative non randomisée (n=20)	Comparaison résorption os autogène vs os IT dans sinus lift	PLGA (Ethicon®) + Fibrine (Tissucoll®)	HBMSC-OB	-	*In vitro:* 6-9 jours	29% résorption os autogène 90% résorption os IT
(63)	6 cas	IT pour Sinus Lift	HA-TCP	HBMSC-OB	-	-	93% succès implants dans os IT
(62)	12 cas	IT pour Sinus Lift	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	Gain 8 mm hauteur os et 100% succès implants (n=41) à 2-6 ans
(61)	8 cas	Défauts osseux alvéolaires horizontaux et verticaux	Phosphate de calcium (Biomatrix®)	ADSC-OB		*In vitro*: 7 jours	Succès 8 cas: Pose des implants à 3 mois
(73)	6 cas	ROG péri implantaire	HA (Proosteon®)	HBMSC-OB	-	*In vitro*: 7 jours	1 seul cas de Néo-formation osseuse par IT sur 6 patients
(59)	Etude Contrôlée Randomisée (n=30)	RTG défauts osseux parodontaux	HA + Fibrine (PRP)	PDSC-OB		-	Meilleurs résultats avec IT (gain d'attache clinique et comblement défauts infra osseux)
(52)	3 cas	Sinus Lift	Fibrine (Tissucoll) PLGA (Ethicon®)	PDSC-OB	-	*In vitro*: 21 jours	100% Succès Os mature à 6 mois
(64)	14 cas	Sinus Lift Greffe en onlay	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	100% Succès
(60)	Etude Contrôlée Randomisée (n=7)	Régénération alvéole (38-48)	Eponges de collagène	DPC-OB (18-28)	-	-	Régénération complète des alvéoles avec IT: supérieur à contrôle
(66)	étude prospective non contrôlée (n=22)	Sinus Lift	Xenogreffe (BioOss®)	HBMSC-OB	-	-	Suffisant pour pose d'implant, mais résorption à 6 et 12 mois
(53)	5 cas	Sinus Lift (comparaison Biocoral® seul vs IT)	PLGA (Ethisorb®)	HBMSC-OB	-	*In vitro*: 6 à 9 jours	Succès des 2 techniques mais densité supérieure avec HA
(51)	Etude Prospective contrôlée randomisée(n=160)	Sinus Lift: (Autogreffe vs IT)	Eponge de collagène	-	rh-BMP2	-	Reconstruction osseuse équivalente avec les 2 méthodes
(54)	Etude Prospective non contrôlée (n=35)	Sinus Lift: (Autogreffe vs IT)	PLGA (Ethicon®)	PDSC-OB	-	8 semaines	Autogreffe + efficace que IT pour sinus lift
(67)	Etude Contrôlée Randomisée (n=31)	Effet du GDF5-ßTCP sur sinus lift vs ßTCP-autogreffe	ßTCP	-	GDF-5	-	Surface de néoformation osseuse sur biopsies similaire test/contrôle
(68)	1 cas	Greffe en onlay sans os autogène	TCP (Vitoss®)	-	rhBMP2		Succès: pose de 6 implants après 4 mois

Tableau 3: Chirurgie Osseuse Reconstructrice Préimplantaire

HBMSC-OB: Cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse, induites vers un phénotype ostéoblastique
HBMSC: Cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse
ADSC-OB: Cellules mésenchymateuses issues de tissu adipeux, induites vers un phénotype ostéoblastique
DPC-OB: Cellules de la pulpe dentaires induites vers un phénotype ostéoblastique
PDSC-OB: Cellules mésenchymateuses issues du périoste, induites vers un phénotype ostéoblastique

PRP: Plasma Riche en Plaquettes
rhBMP-2: Bone Morphogenetic Protein 2 (recombinante)
GDF-5: Growth and Differenciation Factor 5
HA-TCP: Hydroxyapatite - Phosphate Tricalcique
PLGA: copolymère acide polyglycolique + acide polylactique

e) Discussion de l'étude bibliographique

La méthode de recherche bibliographique a suivi les recommandations du « Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations » de la Haute Autorité de Santé (74). Un grand nombre d'articles avec un faible niveau de preuve a été retenu car il existait peu d'études humaines. En effet, de nombreuses études existaient sur des modèles animaux mais peu d'études ont été publiées chez l'homme. Ceci peut s'expliquer par la fiabilité importante des méthodes conventionnelles d'autogreffes dans la prise en charge de la majorité des pertes osseuses maxillo-faciales et alvéolaires et leur morbidité modérée (75,76). La relative nouveauté, la complexité et le coût de certaines méthodes d'IT peuvent expliquer le peu de cas publiés. De plus, 8 équipes ont publié environ la moitié des articles retenus, ce qui montre qu'il existe relativement peu de groupes utilisant l'IT en reconstruction osseuse maxillo-faciale.

Deux paramètres sur quatre définissant l'IT étaient nécessaires pour retenir un article (Scaffold / Cellules / Facteurs de Croissance / Maturation *in vivo* ou *in vitro*). La notion de manipulation est indispensable car elle sous-entend une organisation des rapports entre les différents composants, afin de contrôler la maturation et la régénération tissulaire (1). Les articles utilisant le PRP (Platelet Rich Plasma) ou le PRF (Platelet Rich Fibrin) comme facteurs de croissance n'ont pas été retenus car des controverses persistent sur l'effet ostéo-inducteur réel de ces produits (77). Les méthodes de préparation varient et les résultats sont parfois très différents en fonction du protocole utilisé (78). Cependant, les articles utilisant le PRP comme scaffold ont été inclus.

L'intérêt de l'IT en chirurgie orale et maxillofaciale est fonction de l'indication:

Dans la reconstruction mandibulaire, la principale limite des méthodes conventionnelles de reconstruction (lambeaux autologues libres ou pédiculés) est la mauvaise vascularisation locale des greffons. Elle résulte des caractéristiques anatomiques locales (vascularisation terminale) et de la radiothérapie qui altère de façon durable la vascularisation locale et la composante cellulaire du tissu osseux. L'objectif principal de l'IT dans la reconstruction mandibulaire est la pré-vascularisation et la pré-cellularisation des greffons. La méthode de maturation *in vivo* des PIT a permis dans plusieurs cas de rétablir une néovascularisation qui a persisté après implantation (Tableau 1).

Dans le traitement des fentes faciales et dans la régénération osseuse préimplantaire et parodontale, c'est essentiellement la morbidité liée au site donneur d'os autogène qui a motivé le recours à l'IT (Tableau 2 et Tableau 3) (79). Il faut remarquer que 51 des 55 cas de fentes faciales traités par ingénierie tissulaire provenaient de la même équipe (45,46,50), ce qui montre que l'IT reste marginale dans cette indication.

Les scaffolds utilisés dans les cas de reconstruction mandibulaire étaient des phosphates de calcium (Os Bovin Déprotéiné, HA, HA-TCP, ßTCP) stabilisés par des vis d'ostéosynthèse (26) ou par des cages en titane préformées (23,25,27). Dans le cas publié par Orringer et coll. (24), l'absence de propriétés mécaniques du scaffold (membranes de Dacron imprégnées de BMP), n'a pas permis de contrôler la morphologie de la reconstruction, ce qui a compliqué la réhabilitation prothétique de la patiente. Les complications observées par Warnke et coll. (25) et de Heliotis et coll. (26) sont également directement en rapport avec une défaillance du scaffold (fracture de la cage en titane ou difficultés de fixation du matériau). La

résistance mécanique et la stabilité immédiate des reconstructions est donc un point crucial pour le succès de l'IT au niveau maxillofacial.

Dans les fentes faciales, des matériaux injectables ou très malléables ont été choisis (fibrine, collagène), afin de faciliter leur insertion.

Dans les régénérations osseuses pré-implantaires, les scaffolds étaient très variés (Fibrine, Collagène, PLGA, Phosphates de calcium). Ils avaient globalement des propriétés mécaniques modérées.

Des ostéoblastes dérivés de moelle osseuse (3 cas) ou de tissu adipeux (1 cas) ensemencés dans des scaffolds ont été utilisés dans les reconstructions mandibulaires. Ces rapports de cas ne démontrent pas réellement d'intérêt à associer des cellules au scaffold dans cette indication. Le recours aux cellules complique la procédure (Prélèvement, culture cellulaire et ensemencement) et allonge la durée globale de la reconstruction. L'utilisation des cellules semble plus pertinente en présence de facteurs de croissance.

Dans la reconstruction des fentes faciales, les cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse induites ou non vers un phénotype ostéoblastique ont été utilisées dans 4 cas avec succès. Cependant, la grande variabilité des tableaux cliniques de fentes et le peu de cas publiés ne permet pas de conclure à un apport particulier des cellules autologues dans cette indication.

Dans la régénération osseuse préimplantaire ou parodontale, les cellules autologues ont été utilisées dans 17 cas sur 22. Dans 7 études (55-59,52,54), les ostéoblastes étaient issus d'un prélèvement de périoste, ce qui va dans le sens de procédures moins invasives (prélèvement oral des cellules souches et amplification *in vitro*). Dans plusieurs cas, les cellules souches mésenchymateuses (d'origine médullaire, périostée ou pulpaire) induites vers un phénotype ostéoblastique ont permis d'obtenir une régénération osseuse significative (Sinus Lift (53), alvéoles d'extraction (60), augmentation de crête horizontale (57,61), régénération péri-implantaire (62) ou poches parodontales (59)). Les caractéristiques communes de ces défauts osseux sont d'une part leur volume limité et d'autre part l'absence de contraintes mécaniques appliquées pendant la cicatrisation. Plusieurs études de cas rapportent des taux de succès implantaires proches de 100% (55,63,62,52,64) après des comblements sinusiens par des PIT.

Cependant, les résultats cliniques de l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses autologues sont inconstants. Ainsi, plusieurs études utilisant des hydrogels cellularisés pour greffer des sinus ont révélé les limites de cette approche pour des comblements de volume important, en raison de la limite de diffusion de l'oxygène et des nutriments au sein des scaffolds (56,54). D'autre part, la résorption des volumes greffés par IT est parfois autant voire plus importante qu'avec l'os autogène (65,66). Ceci pourrait être lié à un temps de cicatrisation trop court ou bien à un volume initial très important avec peu d'os résiduel.

Les différences inter-individuelles importantes concernant la quantité et la qualité des cellules souches mésenchymateuses peut aussi expliquer ces résultats inconstants. Enfin, toutes les sources de cellules mésenchymateuses ne sont pas équivalentes (80).

Les BMPs sont des protéines de la famille du TGFß qui jouent un rôle dans le recrutement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (81). L'utilisation des BMP-2 et BMP-7 recombinantes a reçu une Autorisation de Mise sur le Marché aux Etats-Unis et en Europe pour des indications bien précises en orthopédie (fractures ouvertes de la jambe, arthrodèses vertébrales), après plusieurs études prospectives chez l'homme (82). Au niveau maxillofacial, quelques rapports de cas ont montré l'intérêt des BMPs dans la reconstruction mandibulaire après de larges résections osseuses (29,36,44), en complément de chirurgie orthognathique (31) ou après des ostéomyélites (35-37,39). Dans ces cas, des éponges de

collagène, des allogreffes ou de la colle de fibrine étaient utilisés pour apporter sur le site les facteurs de croissance. Des taux de succès importants sont décrits, avec une grande quantité d'os néoformé de forte densité. La consolidation osseuse clinique apparaissait rapidement (1 à 6 mois), même dans des conditions de radiothérapie et d'ostéomyélite (35-37). Dans tous les cas de maturation *in vivo*, les BMPs (humaine, rhBMP2, rhBMP7) ont été utilisées en complément du scaffold pour favoriser le recrutement des cellules mésenchymateuses et leur différenciation en ostéoblastes. On remarque que les BMPs sont utilisées systématiquement dans les cas les plus difficiles de reconstruction osseuse (lésions étendues, terrain défavorable).

La principale complication rapportée de l'utilisation des BMPs est un oedème persistant plusieurs semaines après implantation dans quelques cas (35). Certains essais ont décrit des taux d'échecs importants, qui étaient liés à un manque de pureté des protéines utilisées (origine bovine) (30) à des difficultés opératoires ou à des scaffolds mal adaptés (35). Les limites à l'utilisation des BMPs sont leur risque supposé de dissémination à distance du site d'implantation qui pourrait provoquer des proliférations cellulaires non contrôlées. Des stratégies de couplage des facteurs de croissance aux scaffolds ont été développées pour obtenir un effet strictement local (67). Le coût important de ces traitements est également un obstacle à leur utilisation plus répandue.

La série de Chin et coll. présente 50 cas de fentes labiales, palatines et faciales traitées par des éponges de collagène imprégnées de rhBMP2 et par distraction osseuse. Un taux de succès de 98% (49 reconstructions osseuses sur 50) (50) est décrit, sans aucune autogreffe osseuse, ce qui a réduit de façon importante la morbidité. Cependant, des études randomisées à plus grande échelle sont nécessaires pour valider l'innocuité de ce protocole à long terme.

Dans les reconstructions pré-implantaires, l'utilisation de rhBMP-2 semble très efficace au niveau des sinus maxillaires (51,68), mais également dans les greffes d'apposition (69,68) et dans le comblement de déhiscences péri-implantaires (70). La néo-formation osseuse est rapide et se fait en grande quantité, de façon équivalente ou supérieure aux autogreffes (51). Dans une étude prospective randomisée, la concentration efficace de rhBMP-2 en imprégnation d'éponges de collagène pour la régénération osseuse dans les sinus maxillaires a été évaluée à 1,5 mg/ml (71). Dans une autre étude contrôlée randomisée pour le comblement de sinus, le greffage de rh-GDF-5 (recombinant human Growth and Differenciation Factor) sur un phosphate de calcium (ßTCP) était équivalent au ßTCP non greffé associé à de l'os autogène (67). Dans une étude prospective de 3 ans concernant 10 patients traités pour régénération osseuse préimplantaire par des éponges de collagène imprégnées de rhBMP2, aucune complication locale ou générale en rapport avec les BMPs n'a été retrouvée (69).

Les BMPs ont été utilisées plus souvent dans les reconstructions mandibulaires que dans les régénérations osseuses pré-implantaires. Pour les reconstructions mandibulaires, les BMPs étaient utilisées en dernier recours, lorsque les méthodes conventionnelles (lambeaux) avaient échoué. Le bénéfice attendu de ces molécules était donc supérieur au risque éventuel lié à leur utilisation. Dans le cas des reconstructions pré-implantaires, les solutions alternatives plus invasives (greffes autologues) peuvent être préférables au risque éventuel encouru par l'utilisation de BMPs. De plus, le coût important de ces traitements est un frein important à leur utilisation lorsque des solutions alternatives existent.

Deux méthodes de maturation différentes peuvent être utilisées en fonction de l'objectif recherché.

La maturation *in vitro* de courte durée (entre 4 et 7 jours) a été utilisée dans 1 cas pour la reconstruction mandibulaire, dans 1 cas pour la reconstruction de fentes faciales et dans 7 cas dans les régénérations osseuses préimplantaires. Le but de cette étape était l'adhésion et la prolifération des cellules autologues sur le scaffold avant implantation. Dans certains cas, des

temps de maturation *in vitro* plus longs ont été utilisés (3 à 8 semaines) afin de permettre la sécrétion de matrice extracellulaire et sa minéralisation. La maturation *in vitro* est donc essentiellement utilisée dans la maturation des PIT pour des régénérations pré-implantaires, car elle est peu invasive et parce que l'objectif recherché est surtout un ensemencement des cellules dans le scaffold. Dans tous les cas, la maturation *in vitro* des PIT était faite en conditions statiques: il est probable que l'utilisation de bioréacteurs (conditions de culture dynamiques) pourrait améliorer la quantité et la répartition des cellules ensemencées dans les scaffolds, avec de meilleurs résultats cliniques (3).

A l'inverse, la maturation *in vivo* a uniquement été utilisée dans des reconstructions mandibulaires étendues car elle est beaucoup plus invasive et que l'objectif recherché est la mise en place d'une vascularisation du PIT avant implantation sur le site à reconstruire. Les cinq cas publiés à ce jour ont tous abouti à la mise en place d'une néovascularisation objectivée par les examens complémentaires (scintigraphie ou angio-scanner) après 2 à 8 mois de maturation, et confirmée *in situ* après transfert du lambeau. Le site de maturation *in vivo* était systématiquement au contact d'un muscle, dans une zone très vascularisée non concernée par les traitements antérieurs. Les conditions locales et générales du patient ont également une influence importante sur la cicatrisation. Ainsi, le succès de reconstruction mandibulaire publié par Mesimäki et coll. (23) a été observé après une exérèse de kyste épidermoïde maxillaire récidivant, traité sans radiothérapie, alors que l'échec partiel publié par Warnke et coll. (25) est survenu après un cancer à la mandibule, traité par radiothérapie, chez un patient alcoolo-tabagique partiellement sevré (Figure 3).

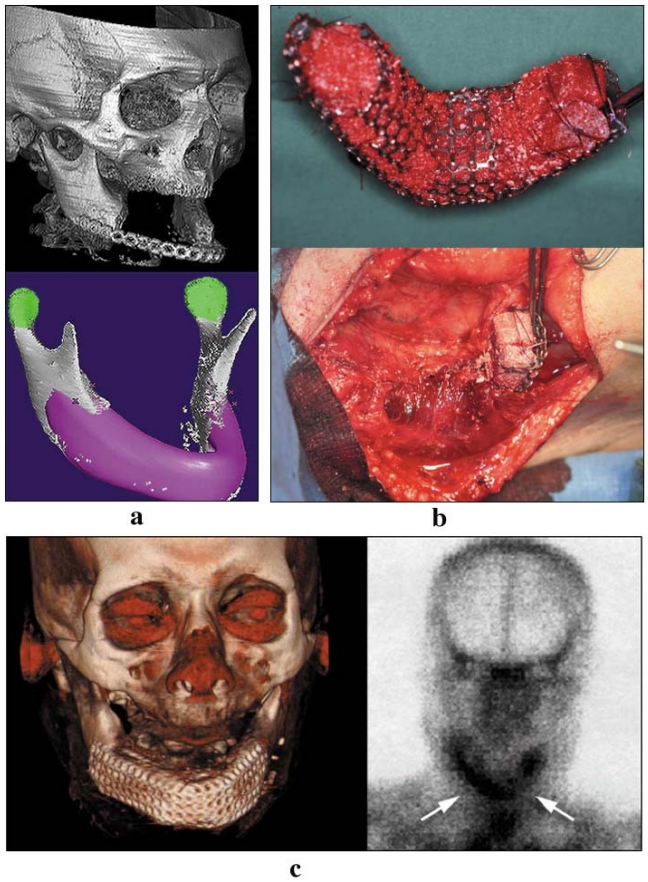


Figure 3: Reconstruction Mandibulaire avec maturation in vivo. (a): défaut initial et modélisation du tissu à reconstruire (b): Cage en titane sur mesure comblée avec de l'os autogène, des blocs de BioOss et des BMP-2 / Maturation in vivo dans la muscle grand dorsal (c):Greffe du tissu néoformé après 8 semaines et scintigraphie montrant l'intégration du greffon ;d'après (25)

La prévascularisation semble donc être une technique prometteuse dans les cas où les méthodes conventionnelles sont inefficaces en raison de conditions locales défaillantes et d'une insuffisance de perfusion sanguine.

Dans deux études, la méthode des membranes induites a été utilisée en reconstruction mandibulaire. Le principal effet de la membrane est celui de mainteneur d'espace alors que les effets sur la prévention de la résorption du greffon et la sécrétion de facteurs ostéo-inducteurs par la membrane sont encore discutés (41,83). L'état tissulaire local antérieur a également une influence sur le succès de cette procédure puisque de meilleures suites opératoires ont été observées dans les situations d'ostéomyélites (100% de succès) (28) que dans les cas d'ostéoradionécrose (50% de succès) (38).

f) Conclusion de l'analyse bibliographique

Les applications de l'ingénierie tissulaire osseuse chez l'homme dans la sphère orale et maxillo-faciale sont encore aujourd'hui limitées et restent largement dans le champ de la recherche. L'IT présente aujourd'hui deux indications principales dans ce domaine, avec des objectifs et des protocoles de traitement très différents.

Dans la reconstruction mandibulaire, les objectifs principaux sont la vascularisation du greffon, mais également la stabilité primaire et la résistance mécanique à court terme des reconstructions. Les cas traités par IT sont systématiquement en échec thérapeutique avec les techniques conventionnelles. Des scaffolds mécaniquement résistants sont utilisés, avec des BMPs et éventuellement des méthodes de prévascularisation *in vivo*. Les cellules sont rarement utilisées dans cette indication car les résultats sont moins prédictibles qu'avec les BMPs. Les premières séries de cas dans la reconstruction mandibulaire ont montré des résultats encourageants mais des études à plus grande échelle sont nécessaires. Les limites des méthodes actuelles sont liées d'une part à un manque d'ajustage et à une mauvaise résistance mécanique des greffons, ce qui peut conduire à des échecs thérapeutiques (26,32). Par ailleurs, certains échecs s'expliquent par un défaut de vascularisation des greffons, en particulier sur un terrain altéré par les traitements antérieurs (radiothérapie).

A l'inverse, dans la régénération osseuse préimplantaire, on recherche une moindre invasivité des procédures chirurgicales, notamment pour éliminer la morbidité des prélèvements d'autogreffes, tout en limitant le recours à des molécules aux effets secondaires potentiellement importants (BMPs). Les scaffolds n'ont pas besoin d'une grande résistance mécanique mais il doivent être malléables. Ils sont plus souvent cellularisés *in vitro* avant implantation et les BMPs sont rarement utilisées. Dans cette seconde indication, l'ingénierie tissulaire a déjà montré des résultats similaires aux méthodes de référence, ce qui pourrait ouvrir la voie à des protocoles chirurgicaux moins invasifs. Cependant, la principale limite de l'ingénierie tissulaire dans cette indication est liée à l'ensemencement cellulaire qui n'est pas toujours efficace. En effet, les méthodes actuelles ne permettent pas de contrôler la densité ni l'organisation cellulaire au sein des biomatériaux.

On voit donc que dans ces deux grandes indications de l'ingénierie tissulaire osseuse dans la sphère orale et maxillofaciale, un certain nombre de limites apparaissent. Le manque de contrôle de la structure externe et de la forme générale des scaffolds nuit à leur adaptation avec les tissus adjacents. Le manque d'organisation de la partie interne des scaffolds ne va pas favoriser la mise en place de néo-vaisseaux, préalable indispensable à la régénération tissulaire. Enfin, l'ensemencement des cellules autologues dans les scaffolds se fait le plus souvent « à l'aveugle », sans contrôler leur organisation au sein du néo-tissu.

Plusieurs développement conceptuels et technologiques récents devraient contribuer à répondre - au moins en partie - aux limites actuelles de l'ingénierie tissulaire osseuse. Ainsi, des méthodes de prototypage rapide de scaffolds existent et permettent d'organiser la forme

générale et la structure interne des matériaux. Plus récemment, des méthodes de micro-manipulation d'éléments biologiques (Bioprinting) sont apparues, et permettent de fabriquer des micro-tissus organisés à partir de cellules et d'hydrogels. Ces méthodes ont pour objectif commun de fabriquer les biomatériaux ou les tissus couche après couche, ce qui permet de maîtriser l'organisation interne de la structure.

2. LA « BIO-FABRICATION »:

2.1. Historique et Concepts

Nous avons pu identifier précédemment certaines limites actuelles de l'ingénierie tissulaire pour la régénération osseuse orale et maxillofaciale. Il s'agit tout d'abord de la difficulté de reproduire l'architecture des tissus tant au niveau macroscopique (forme générale des organes) que microscopique (organisation tridimensionnelle des cellules et des autres composants organiques et non organiques du tissu). Le second point critique est la vascularisation des matériaux implantés qui est rarement obtenue dans le cas des reconstructions volumineuses. Parmi les méthodes de fabrication tissulaire en 3D, certaines permettent de fabriquer des scaffolds sans cellules, d'autres sont utilisées pour organiser les cellules ou des agrégats cellulaires, mais il est également possible d'organiser les cellules et le scaffold de façon concomitante (84).

Les applications de la conception et de la fabrication d'objets assistées par ordinateur (CAD-CAM) en ingénierie tissulaire ont concerné au départ la fabrication de scaffolds. En effet, ces nouvelles technologies de prototypage rapide ont permis de résoudre certaines limitations des scaffolds conventionnels (4) en contrôlant l'architecture interne des matériaux. La principale originalité du prototypage rapide est que la fabrication couche par couche des matériaux. Dans les méthodes conventionnelles de production de scaffolds, des moules ou des porogènes sont utilisés, ce qui ne permet pas de contrôler précisément l'architecture interne des matériaux (85). Avec le prototypage rapide, la forme du matériau est définie à l'avance, mais on peut également améliorer l'ensemencement cellulaire et la mise en place de la vascularisation puisque l'architecture interne (porosité, interconnection, travées vasculaires) est aussi réalisée sur mesure. De plus, les propriétés biologiques et mécaniques peuvent être modifiées en fonction de l'utilisation du matériau. Cependant, l'utilisation du prototypage rapide pour fabriquer des scaffolds ne permet pas de s'affranchir de l'ensemble des inconvénients inhérents à cette approche (ensemencement cellulaire, vascularisation). On reste toujours dans une procédure d'ingénierie tissulaire « basée sur le scaffold »).

Le bioprinting (impression d'éléments biologiques) est ensuite apparu progressivement lorsque les nouvelles imprimantes ont permis l'utilisation d'éléments biologiques et le maintien de leurs propriétés après impression. Le tournant conceptuel le plus récent est la notion d'ingénierie tissulaire sans scaffold ou « organ printing » définie par Mironov et coll. qui envisagent de réaliser des tissus en superposant des agrégats cellulaires. L' « Organ Printing » est défini comme « la biofabrication couche par couche, assistée par ordinateur, de tissus tridimensionnels macroscopiques fonctionnels et d'organes, en utilisant des sphéroïdes tissulaires comme briques élémentaires » (Figure 4) (86,5).

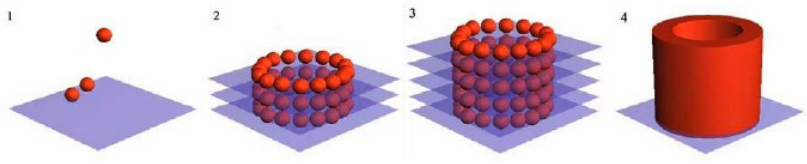


Figure 4: Le concept de micro-impression d'éléments biologiques (Bioprinting): Le tissu est fabriqué par dépôt de couches successives d'encres biologiques (bioink). Il peut s'agir de cellules (rouge) et de matrice extracellulaire (bleu). D'après (5)

Le postulat de départ de ce concept d'ingénierie tissulaire sans scaffold est que la réparation

tissulaire et la construction d'organes pourrait se faire avec des principes similaires à ceux observés dans la biologie du développement lors du développement embryonnaire par fusion dirigée d'agrégats cellulaires. A partir de ce concept, plusieurs méthodes de bioprinting basées sur la micromanipulation de cellules, d'agrégats cellulaires, de biomatériaux ou de protéines de la matrice extracellulaire ont été décrites. La construction tridimensionnelle couche par couche est aussi un point essentiel de cette approche.

Nous allons maintenant détailler les méthodes de prototypage rapide utilisées pour fabriquer des scaffolds et leurs applications. Ensuite nous présenterons les différentes méthodes de bioprinting avec un accent particulier sur le bioprinting assisté par laser.

2.2. Méthodes pour organiser le scaffold: Prototypage rapide

Les progrès dans le domaine de la conception et la fabrication d'objets assistée par ordinateur (CAD-CAM) ont permis l'essor du prototypage rapide pour la médecine régénératrice. Les différentes méthodes ont pour point commun de construire des scaffolds organisés en 3 dimensions à partir de polymères. De plus la fabrication de ces échafaudages se fait couche par couche afin de contrôler les propriétés internes du matériau (4). L'utilisation de l'informatique permet de créer des structures de forme complexe, et éventuellement de réaliser des pièces «sur mesure» à partir d'images radiologiques (17). De plus, la vitesse de fabrication, la précision et la reproductibilité de ces méthodes est beaucoup plus importante que les méthodes non automatisées. De façon générale, les méthodes de fabrication 3D sont basées sur l'utilisation de la chaleur, de la lumière (lasers), d'adhésifs ou sur le moulage du scaffold (84).

Le type de matériau (polymère, céramiques, poudres, liquides), l'adhésion entre les couches (solvants, température) et le principe physique de fabrication (laser, jet d'encre, extrusion) diffèrent selon la technique utilisée. Certaines techniques utilisent des porogènes qu'il est nécessaire d'éliminer à la fin de la fabrication.

a) Stéréolithographie (SLA)

La stéréolithographie est une des premières techniques de prototypage rapide qui a été utilisée (4). Le principe est d'utiliser un laser à UV pour photo-polymériser sélectivement une résine liquide. Lorsqu'une première couche est polymérisée, le bain de résine est rempli et le laser polymérise une deuxième couche juste au dessus. L'objet reste immergé dans le bain de polymère pendant toute la procédure puis l'excès de résine est supprimé. Ensuite, l'objet est recuit dans un four à UV. La résolution est déterminée par la résolution de déplacement vertical du support et par la taille du spot du laser. Les matériaux utilisés sont des polymères comme le Polyéthylène Glycol (PEG) (21).

La principale utilisation est la modélisation et la planification d’interventions chirurgicales (Figure 5) (87-89). Il est également possible d'utiliser la stéréolithographie pour réaliser des moules en résine qui sont ensuite infiltrés avec des solutions d’hydroxyapatite pour réaliser des scaffolds frittés avec des architectures internes et externes prédéfinies (21).

Cependant, la résolution est limitée du fait de contractions pendant la fabrication et à cause de la cuisson finale qui modifie la régularité de la structure. Enfin, les conditions de préparation de ces scaffolds ne permettent pas d’inclure des éléments biologiques pendant la fabrication. On doit cellulariser le scaffold dans un second temps.

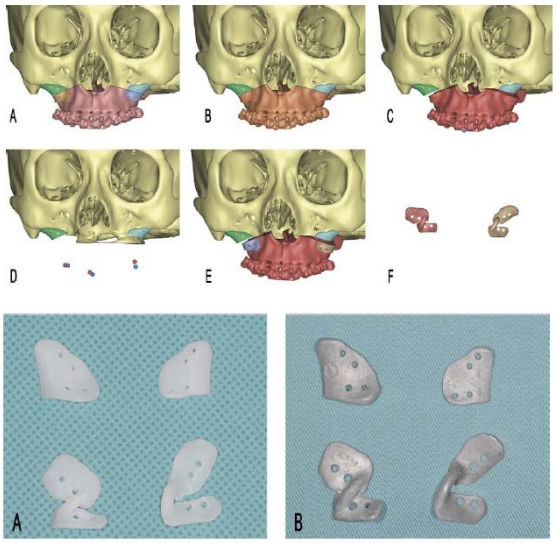


Figure 5: Planification d'une chirurgie orthognatique (haut A-F) puis réalisation de plaque d'ostéosynthèse sur mesure par Stéréolithographie (Bas, A). Les plaques sont ensuite coulées en métal et utilisées pour la chirurgie (Bas, B); D'après (87)

b) Frittage Sélectif par Laser (Selective Laser Sintering: SLS)

Dans cette technique, un laser à CO2 est utilisé pour fritter une poudre (polymère, céramiques, métaux ou composites) afin de former les couches successives du matériau. Le faisceau est déplacé en surface de la poudre grâce à un scanner et les couches fusionnent entre elles au cours de la fabrication. Le scaffold final repose dans la poudre non frittée et il faut alors éliminer les excès de poudre. La porosité peut être ajustée en modifiant la vitesse de déplacement du scanner, l'intensité du laser, la température du récipient contenant la poudre et la taille de la poudre (85).

Cette méthode permet la réalisation de structures très poreuses et inter connectées avec une grande reproductibilité. Aucun solvant n'est nécessaire puisque les couches sont liées entre elles par frittage (85). Cependant, la taille des pores est limitée à 50 µm au maximum et la taille des pores n'est pas très homogène. De plus, la température de fabrication est élevée, ce qui implique l'utilisation de matériaux poudreux stables à de hautes températures. Ce problème de température empêche le transfert d'éléments biologiques ou de cellules vivantes et les hautes températures peuvent modifier la structure de certains matériaux (85,90).

c) Impression en 3 dimensions (Three-dimensional Printing: 3DP)

Pour le 3D Printing, les matériaux sont sous forme de poudre (céramiques, métaux ou polymères). Le principe est d'étaler une couche du matériau poudreux sur le support, puis une colle liante (binder) est imprimée sur la poudre pour délimiter une forme en 2D. Ensuite, une deuxième couche de poudre est déposée, puis la colle est à nouveau projetée et vient lier les deux couches entre elles. Les cycles sont répétés jusqu'à obtention de la structure en 3D puis les excès de poudre sont éliminés par brossage à la fin de la procédure. Cette technique de construction 3D automatisée a été largement étudiée pour la fabrication de scaffolds en ingénierie tissulaire (85).

Les scaffolds obtenus par cette technique peuvent avoir une forte inter-connectivité et la micro-structure peut être adaptée en modifiant la vitesse de l'imprimante, le flux de matériau

et la position de la tête d'impression. La fabrication se déroule à température ambiante et il est possible d'incorporer des éléments biologiques si le solvant liant les couches entre elles est biocompatible (gélatine, dextran) (17).

Les inconvénients de cette méthode sont liés à la présence de poudre résiduelle non liée dans les pores du matériau qui peut former des agrégats (17). De plus, la taille des pores est dépendante de la taille de la poudre (50 à 200 µm) (17,85). Il est donc nécessaire d'inclure des porogènes pour accroître la taille des pores, ce qui nécessite l'utilisation de solvants organiques et de résidus toxiques (85).

d) Méthodes basées sur l'extrusion de matériau en phase plastique

Plusieurs méthodes sont basées sur le principe de l'extrusion de matériau en phase plastique. La FDM (Fused Deposition Modeling: Modelage de Matériau en Fusion) est la plus répandue mais d'autres techniques utilisant l'extrusion à froid avec d'autres matériaux existent également (3D-Plotting, Precise Extrusion Manufacturing) (4).

Le principe de la FDM est de déposer par extrusion à chaud un matériau visqueux sous forme de lignes parallèles sur chaque plan. L'orientation des lignes est modifiée entre chaque plan afin de créer des structures tridimensionnelles dont la taille des pores, la porosité et l'interconnectivité sont contrôlées. La modification de l'orientation du pistolet et le réglage des paramètres d'extrusion (vitesse de déplacement, flux de matériau) permet d'adapter le diamètre des fibres. Les couches fusionnent entre elles avant le séchage complet du matériau. Un matériau thermoplastique doit être utilisé puisqu'il est réchauffé avant d'être injecté et qu'il durcit en refroidissant. La gamme de matériaux utilisables en FDM est assez restreinte puisqu'ils doivent être thermoplastiques avec une viscosité adaptée. Il peut s'agir de polymères seuls (PCL) ou de polymères associées à des céramiques (PCL/HA). L'adjonction de phosphates de calcium permet d'améliorer la biocompatibilité et les propriétés mécaniques des scaffolds.

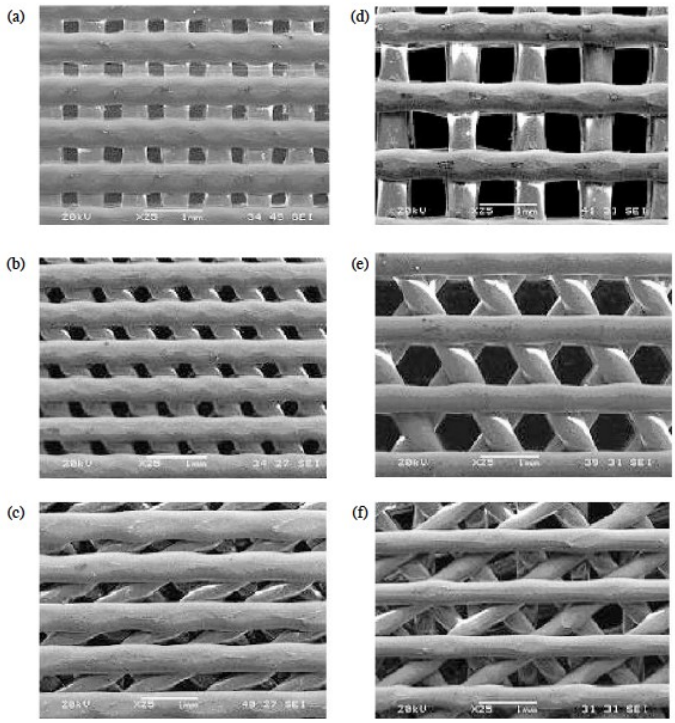


Figure 6: Variation de la porosité de scaffolds produits par Fused Deposition Modeling; D'après (85)

Cette technique permet la réalisation d'une grande variété de motifs. De plus, la micro-architecture interne (taille des pores, porosité, inter-connectivité) peut être définie précisément en ajustant l'angle de dépôt du matériau, l'épaisseur des lignes ou encore l'espacement entre les lignes. Ces paramètres peuvent être modifiés entre chaque couche, ce qui permet d'obtenir des pores de taille variable au sein du même scaffold (Figure 6) (85).

Cette technique d'extrusion par prototypage rapide a été utilisée pour réaliser un moule en résine qui a ensuite été rempli d'une solution de phosphate de calcium. Dans un second temps, le moule et son contenu ont été frittés afin d'éliminer la résine et de fritter la céramique. Ainsi, la structure régulière construite par prototypage rapide a été reproduite en négatif sur le scaffold en céramique (91).

Des solutions d'hydroxyapatite peuvent être réalisés directement par extrusion d'une solution d'hydroxyapatite contenant des résines polymérisant après impression. Dans un second temps le matériau est fritté, ce qui permet d'éliminer la phase résineuse pour obtenir un scaffold de céramique (92).

Le principal inconvénient de ces méthodes d'extrusion est que les cellules ne peuvent pas être incorporées dans la structure au moment de la fabrication du scaffold du fait des conditions de température utilisées ou de la toxicité des polymères utilisés.

e) Filage de membranes sous l'effet d'un champ électrique (Electrospinning)

L'électrospinning est une technique dérivée de la FDM où le matériau est utilisé sous forme de filaments très fins (quelques µm ou dizaines de µm). Le but de l'électrospinning est de fabriquer à l'aide d'un champ électrique des membranes dont l'épaisseur et le diamètre des fibres sont contrôlées.

Le principe est d'utiliser une solution de polymère placée dans une seringue munie d'une fine aiguille métallique reliée au pôle positif d'un générateur à haute tension. Le débit de la solution dans la seringue est contrôlé par une pompe péristaltique. La cible réceptrice doit être recouverte d'une feuille métallique reliée au pôle négatif du générateur. Lorsque l'intensité du champ électrique dépasse la tension de surface de la solution de polymère à l'extrémité de la seringue, une goutte est arrachée et forme un filament qui vient se déposer sous la forme d'une fibre sur le collecteur. Le réglage de la tension, du débit de la seringue et de la distance entre la seringue et la cible permettent d'obtenir des fibres de diamètre et de densité variables sur la cible.
En fonction de l'épaisseur du réseau de fibres déposées sur le support, il est possible de fabriquer des structures bi- ou tri-dimensionnelles (93,94). Il est également possible de faire varier le diamètre des fibres au sein d'un même scaffold préparé par électrospinning (Figure 7) (95).

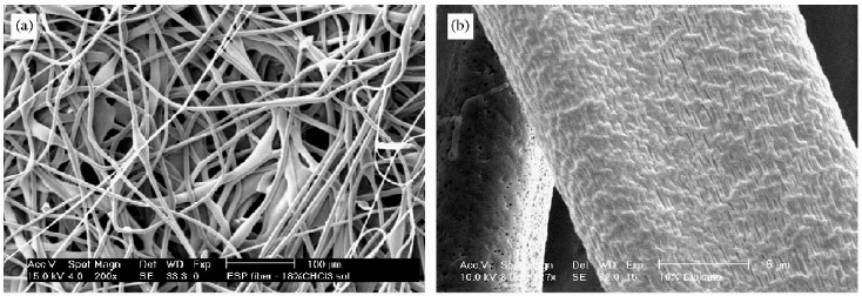


Figure 7: Membranes de PCL tissées par elctrspinning. D'après (93)

f) Combinaison de méthodes

Il est possible de coupler ces différentes méthodes pour mettre à profit les avantages de chaque technique. Ainsi, Centola et Coll. (96) ont combiné l'electrospinning et la FDM pour produire des prothèses vasculaires. L'electrospinning a d'abord été utilisé pour fabriquer la partie interne de la prothèse avec un polymère de PLLA couplé à l'héparine, puis la partie externe de la prothèse a été réalisée par FDM pour apporter des propriétés mécaniques à l'ensemble. La partie interne permettait de délivrer des facteurs anti-thrombotiques tout en apportant un micro-environnement favorable à la prolifération des cellules endothéliales. La partie externe a apporté la résistance mécanique qui manquait au scaffold interne.

L'ajout d'un hydrogel à base d'acide hyaluronique déposé par spray sur une membrane de PCL préparée par électrospinning a permis d'améliorer la prolifération et la pénétration d'ostéoblates humains dans le scaffold (97).

Dans une autre étude, le scaffold a été réalisé par prototypage rapide (polymérisation multi-photonique) puis les cellules ont été imprimées à l'intérieur grâce à une technique d'impression laser. Ceci a permis d'ensemencer plusieurs types cellulaires dans le même matériau et de les répartir précisément (98).

2.3. Le Bioprinting et l'Organ Printing

a) Définitions

Le « Bioprinting » peut se traduire par « Impression d'éléments biologiques ». Il s'agit des méthodes qui permettent de manipuler et d'organiser à l'échelon cellulaire des éléments biologiques vivants (cellules) ou inertes (matrice extracellulaire, facteurs de croissance), sans perdre leur fonction biologique. Les principes communs du bioprinting sont l'utilisation d'éléments biologiques vivants imprimés en 2 et 3 dimensions, sans scaffold pré-existant. Les encres sont des solutions d'hydrogels qui contiennent des cellules, des protéines (collagène, facteurs de croissance) ou des bio-matériaux (hydroxyapatite). Les imprimantes sont basées sur trois technologies principales: il s'agit du jet d'encre, de l'impression assistée par laser et des micro-seringues pour la manipulation d'agrégats cellulaires. La planification informatique et la réalisation par prototypage rapide sont également inhérentes au bioprinting puisqu'elles permettent d'obtenir une haute résolution (à l'échelon cellulaire) et une exécution rapide. La précision, la reproductibilité et la rapidité d'exécution des impressions représentent les principaux avantages du bioprinting sur les méthodes conventionnelles de reconstruction tissulaire.

L' « Organ Printing » est un concept dérivé des premiers résultats du bioprinting qui est défini comme « la biofabrication couche par couche, assistée par ordinateur, de tissus tridimensionnels macroscopiques fonctionnels et d'organes, en utilisant des sphéroïdes tissulaires comme briques élémentaires » (5). Il s'agirait dans ce cas de fabriquer des organes avec cette nouvelle technologie pour assembler différents types cellulaires, mais aussi la matrice extra cellulaire et le réseau vasculaire d'un organe comme le rein. Cette vision à long terme permet d'imaginer des applications très concrètes du bioprinting, mais les applications à plus court terme sont plutôt du domaine de la recherche fondamentale et dans la réalisation d'études pharmacologiques. En effet, la capacité du bioprinting à organiser précisément des éléments biologiques à grande échelle avec une bonne reproductibilité pourrait permettre de réaliser des tests pharmacologiques systématiques (99).

La plupart des méthodes de bioprinting sont dérivées de méthodes inventées pour assembler des composants électroniques (100). Cependant, dans ce travail, nous avons restreint nos recherches aux applications en biologie de ces méthodes, en particulier aux

impressions de cellules et d'hydrogels. Le but de cette partie est de présenter le principe, les intérêts et limites ainsi que les principales applications des méthodes de bioprinting.

b) Les imprimantes à jet d'encre

Les premières impressions d'éléments biologiques par jet d'encre ont été réalisées avec des imprimantes de bureau modifiées. L'encre des cartouches a simplement été remplacée par des solutions de cellules en suspension et les têtes d'impression ont été adaptées. Ensuite, des prototypes dédiés à l'impression d'éléments biologiques ont été mis au point. Les expérimentations se font à température ambiante pour préserver le matériel cellulaire.

Les imprimantes à jet d'encre sont composées d'une tête d'impression, d'un réservoir pour l'encre, d'un substrat receveur et d'un système de contrôle par informatique. Les têtes d'impressions fonctionnent selon un mécanisme thermique (thermal ink-jet) ou piézo-électrique (piezo-electric ink-jet) (101) et elles peuvent être utilisées en parallèle. Les encres sont composées de cellules suspendues en phase acqueuse, dans des polymères thermoréversibles ou encore dans des hydrogels. La viscosité de l'encre et les paramètres d'impression (volume des gouttes, fréquence d'éjection) doivent être ajustés pour induire un minimum d'effets thermiques néfastes pour les cellules.

Les têtes d'impression thermiques fonctionnent grâce une impulsion thermique brève qui provoque la formation d'une bulle de vapeur. La pression exercée par cette bulle entraîne l'éjection d'une gouttelette d'encre. Les têtes d'impression piézo-électriques fonctionnent grâce l'application d'une tension électrique brève qui provoque la déformation du réservoir d'encre. Cette déformation brève induit l'éjection de la gouttelette. Lorsque la tension est supprimée, le réservoir reprend sa forme initiale et il se remplit par aspiration d'encre pour l'éjection de la goutte suivante. Il semble que les imprimantes jet d'encre avec des têtes piézo-électriques aient moins d'effets néfastes sur les cellules que les têtes à effet thermique (Figure 8) (102).

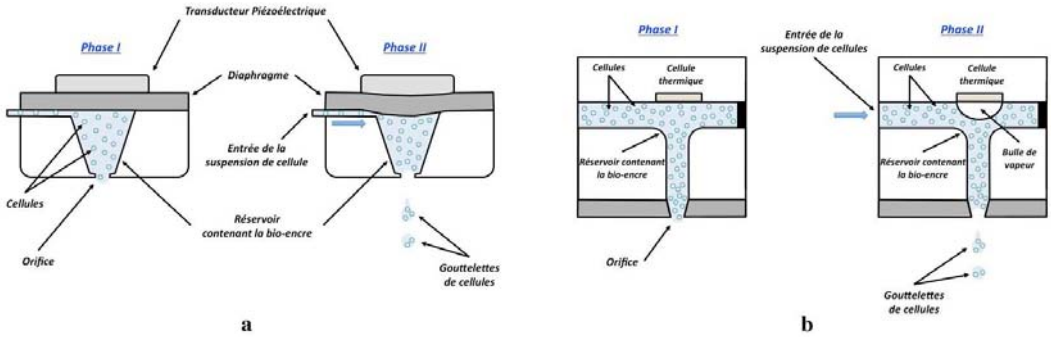


Figure 8: Principe des imprimantes à jet d'encre piézo-électrique (a) et thermiques (b)

Des contraintes de cisaillement sont exercées sur les cellules (shear stress) à plusieurs étapes de l'impression par jet d'encre. Celles-ci surviennent lors de (1) la pression exercée dans la tête d'impression, (2) la passage de l'encre par l'orifice de la tête d'impression, (3) la formation et l'éjection de la goutte, (4) l'impact de la goutte sur le substrat receveur et (5) lors du remplissage de la tête d'impression. Il est donc nécessaire d'adapter la viscosité des encres de cellules pour minimiser la mort cellulaire lors de l'impression. De plus les cellules en suspension dans l'encre peuvent obstruer les têtes d'impression, ce qui implique l'utilisation de solutions relativement peu concentrées autour de 10^5 à quelques millions de cellules / ml (102,103).

Les premiers résultats avec des têtes d'impression « thermiques » ont montré que la majorité des cellules endothéliales bovines survivaient à l'impression (104,105). De faibles concentrations cellulaires étaient utilisées (10^5 cellules / ml) et des gouttes de 150µm de

diamètre (sur Matrigel®) étaient obtenues. Ensuite, des neurones ont été imprimés avec le même système avec le maintien de la viabilité et des capacités de prolifération après impression (106). Enfin, le même groupe a imprimé des neurones en 3D grâce à des supports de fibrinogène polymérisés par la thrombine. Des tests électrophysiologiques *in vitro* ont confirmé le fonctionnement des cellules après impression (107). Plus récemment, des cardiomyocytes félins suspendus dans une solution d'alginate ont été imprimés directement dans une solution de chlorure de calcium afin de gélifier les gouttes lors de l'impression. Ceci a permis d'imprimer une structure tridimensionnelle en forme d'un coeur avec 2 ventricules, et le battement synchrone des cardiomyocytes a été enregistré après une stimulation électrique. Les cellules ont donc conservé leur fonction dans l'alginate dans un environnement tridimensionnel (108).

L'impression de cellules endothéliales bovines par jet d'encre piézo-électrique n'altère pas la viabilité des cellules. De plus, le nombre de cellules par gouttes est directement corrélé à la concentration cellulaire de la solution initiale (102). Le maintien de la viabilité pour des conditions « extrêmes » d'impression a été observé sur des cellules de lignée de fibroblastique avec plusieurs conditions d'énergie et de fréquence (103). Cependant, les auteurs soulignent qu'au delà de 20 minutes d'expérimentation, les cellules s'agrègent et qu'elles obstruent la buse de la cartouche.

Avec des solutions de cellules, la taille des gouttes est comprise entre 80 et 250µm. Plus la concentration cellulaire est importante, plus la densité de cellules dans chaque goutte augmente (102,105). L'impression de solutions sans cellules permet d'atteindre des résolutions bien supérieures et des gouttes beaucoup plus petites, de l'ordre d'une à quelques dizaines de µm (102).

L'agrégation des cellules et l'obstruction des têtes d'impression est donc la principale limite de l'impression de cellules par jet d'encre. En effet, il n'est pas possible d'utiliser des concentrations cellulaires supérieures à 1 ou 2 millions de cellules / ml, car au delà l'encre est trop visqueuse et ne peut pas être imprimée avec une résolution satisfaisante. La densité de cellules imprimées est donc limitée avec le jet d'encre.

Les imprimantes à jet d'encre permettent aussi l'impression d'hydrogels, qui peuvent alors jouer le rôle de support d'impression et de matrice extracellulaire pour des cellules imprimées dans un second temps. Ainsi des solutions d'alginate de sodium ont été imprimées dans une solution de Chlorure de calcium pour permettre la gélification de l'alginate immédiatement après impression pour former des structures tridimensionnelles (109,108). Plusieurs concentrations d'alginate peuvent être utilisées en fonction de l'application recherchée (110). Une approche similaire a été utilisée en imprimant une solution de thrombine sur un support recouvert de fibrinogène, ce qui aboutissait à la gélification sélective du fibrinogène en fibrine (107). Le développement de matrices biocompatibles est crucial pour aboutir à de réelles structures tridimensionnelles (111). Ces matrices à base d'hydrogels (fibrine, alginate, gélatine) peuvent être imprimées seules comme matrice extra-cellulaire ou bien elles peuvent entrer dans la composition des encres cellulaires.

L'organisation de BMP sur des membranes de Dermagraft® a permis d'orienter sélectivement la différenciation de progéniteurs ostéoblastiques *in vitro* (11) ainsi que la régénération osseuse *in vivo* chez la souris (112). Le couplage chimique de la BMP sur la membrane de Dermagraft a permis d'éviter la diffusion des BMPs à distance de la zone imprimée. Cette étude montre que la BMP n'est pas modifiée par l'impression par jet d'encre (système piézoélectrique) et qu'il est possible d'orienter la néoformation osseuse grâce à une approche de bioprinting.

c) Les Micro-Seringues

Des micro-seringues ont été mises au point afin d'imprimer des éléments biologiques. Dans le système Bioplotter®, une seringue dont le débit est contrôlé par un système pneumatique, est utilisée pour dispenser un hydrogel associé ou non à des cellules. L'appareillage comprend 3 axes de translation dans les 3 plans de l'espace et il est contrôlé par informatique pour imprimer les éléments couche par couche. Le matériau est extrudé de façon continue à travers une buse de 100 à 450µm de diamètre. Ainsi, des constructions 3D comprenant des hydrogels (alginate, lutrol F127, Matrigel ou agarose) et des cellules (cellules souches mésenchymateuses de chèvre) ont été imprimées sous la forme de scaffolds rectangulaires en plusieurs couches. Les résultats ont montré une survie cellulaire similaire entre les cellules imprimées et les témoins quel que soit l'hydrogel utilisé. La modification de la pression appliquée aux solutions de cellules n'a pas modifié ces résultats (113). Cette méthode est prometteuse car elle permet de construire des matériaux en 3D avec des cellules intégrées (Figure 9).

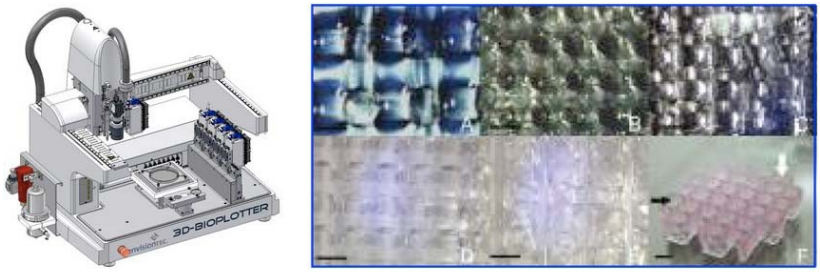


Figure 9: Imprimante "Bioplotter®" utilisée pour l'extrusion d'hydrogels (Gauche). Résultats d'impressions d'alginate (a), d'agarose (b), de methylcellulose (c), de lutrol (d-f) (Droite); D'après (113)

Certains systèmes de micro seringues permettent également la manipulation de sphéroïdes cellulaires afin de créer des assemblages tridimensionnels. Les sphéroïdes sont des amas cellulaires qui sont formés *in vitro*: lorsque les forces d'attraction inter-cellulaires sont supérieures aux forces d'adhésion des cellules sur la surface de la boite de culture, des agrégats de cellules apparaissent (114,115). Le concept d'Organ Printing est basé sur l'agencement précis des sphéroïdes grâce à des micro-seringues, ce qui permet ensuite leur fusion (5). Dans cette méthode, les tissus sont imprimés couche après couche, sans scaffold, en alternant des couches de cellules et des couches d'agarose qui seront retirées après quelques jours de culture *in vitro*. Cette méthode a permis d'obtenir des tubes cellularisés ressemblant à des canaux vasculaires avec le système Organovo® (Figure 10).

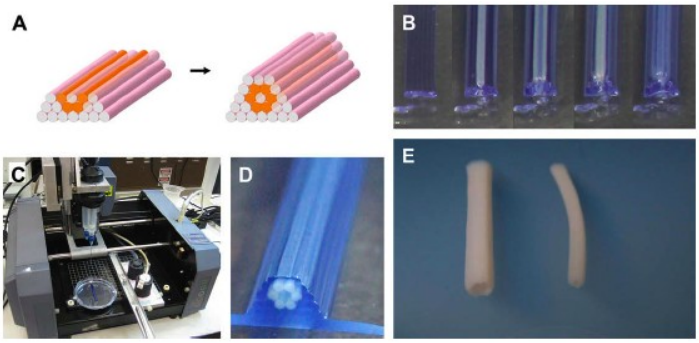


Figure 10: Tubes formés par extrusion de sphéroïdes cellulaires et de "boudins" d'agarose. (a) schéma de l'impression couche par couche; (b, d) vue finale des impressions; (c) Appareillage Organovo®; (d) vue du tube cellulaire après retrait de l'agarose. D'après (114)

La taille maximale des agrégats cellulaires pour l'Organ Printing serait de 600µm environ afin de permettre la survie des cellules internes (104). De nombreuses représentations schématiques des utilisations potentielles des sphéroïdes existent (5,116-118) mais il existe relativement peu de résultats de ce concept. Mironov et coll. ont montré que des agrégats cellulaire de cellules musculaires lisses pouvaient fusionner lorsqu'ils étaient placés à proximité (5). Des vaisseaux artificiels biomimétiques ont également construits avec des fibroblastes et des cellules musculaires lisses qui ont été organisées en 3D pour former des tubes vasculaires de 0,6 à 2,5mm. Les cellules ont été utilisées sous forme de sphéroïdes ou de cylindres de 300 à 500µm de diamètre avec un moule en agarose servant à former la lumière vasculaire. Les résultats montrent des tubes avec une ou deux couches cellulaires bien séparées qui se sont réorganisées progressivement lors des 3 premiers jours de culture (114).

d) La Microimpression d'éléments biologiques Assistée par Laser

Le principe, le mécanisme physique et les résultats expérimentaux de la micro-impression d'éléments biologiques Assistée par Laser (Laser-Assisted Bioprinting: LAB) seront développés dans la partie suivante (Page 37).

3. La Microimpression d'éléments biologiques Assistée par Laser (LAB)

3.1. Principe général

Les trois principaux éléments d'un système LAB sont une source laser pulsée, une lame recouverte d'une fine couche de l'encre utilisée (lame donneuse) et une seconde lame réceptrice placée à quelques centaines de µm de la première (lame réceptrice). A partir de ce principe général, plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature (LIFT[1], AFA-LIFT[2], MAPLE-DW[3], Bio-LP[4], BA-LIFT[5]). Les principales différences entre ces méthodes concernent le type de laser utilisé et la présence ou non d'une couche absorbante/transductrice sur la lame donneuse (Figure 11).

Différents lasers impulsionnels ont été utilisés à la fois nano- et femto-seconde, avec une longueur d'onde située dans l'UV (193, 248, 266 et 355 nm) (119) ou dans l'infra-rouge (1064 nm) (120,121).

Dans les cas où l'énergie laser peut être absorbée directement par l'encre, la formation d'un jet découle directement de la création d'une cavité dans l'encre suite à la vaporisation des premières couches moléculaires d'encre au point de focalisation (MAPLE-DW) (122). Dans le cas où l'énergie laser n'est pas absorbée par l'encre, il convient d'interposer une couche absorbante/transductrice dont le rôle sera de convertir l'énergie lumineuse en énergie thermique (Bio-LP) et/ou mécanique (BA-LIFT, AFA-LIFT). Cette couche absorbante de quelques dizaines de nm est métallique pour le Bio-LP (or, titane, argent (123,119)), alors qu'elle est composée de polyimide (124) pour le BA-LIFT.

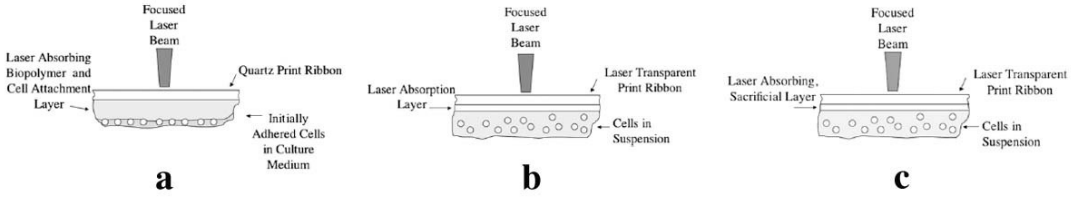


Figure 11: Interaction entre le laser et la lame donneuse dans le MAPLE-DW (a), le LIFT (b) ou le Bio-LP (c); d'après (125)

Dans le cadre de ce travail, nous avons plus particulièrement porté notre intérêt sur le principe d'éjection des gouttes avec le LAB, qui est directement inspiré du Bio-LP.

3.2. Principe physique de l'éjection des gouttes par LAB

Comme présentée sur la (Figure 12) la micro-impression d'éléments biologiques assistée par laser est une technologie complexe dont les résultats dépendent de nombreux paramètres. Il faut à la fois prendre en compte les paramètres laser (longueur d'onde, énergie, fréquence, diamètre du spot), les conditions de focalisation (diamètre du spot et distance de

1 LIFT: Laser Induced Forward Transfer
2 AFA-LIFT: Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer
3 MAPLE-DW: Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation Direct Write
4 Bio-LP: Biological Laser Printing
5 BA-LIFT: Blister-Assisted Laser Induced Forward Transfer

travail), la vitesse d'écriture (vitesse de balayage, miroirs galvanométrique et/ou vitesse de déplacement des platines motorisées), les propriétés de l'encre (viscosité, tension de surface, épaisseur du film), la présence ou non d'une couche absorbante (nature du matériau, épaisseur du film), les propriétés du substrat receveur (mouillabilité, épaisseur du film d'hydrogel) ainsi que l'espacement entre la lame donneuse et le substrat receveur (entrefer), les conditions de température et d'hygrométrie de la pièce.

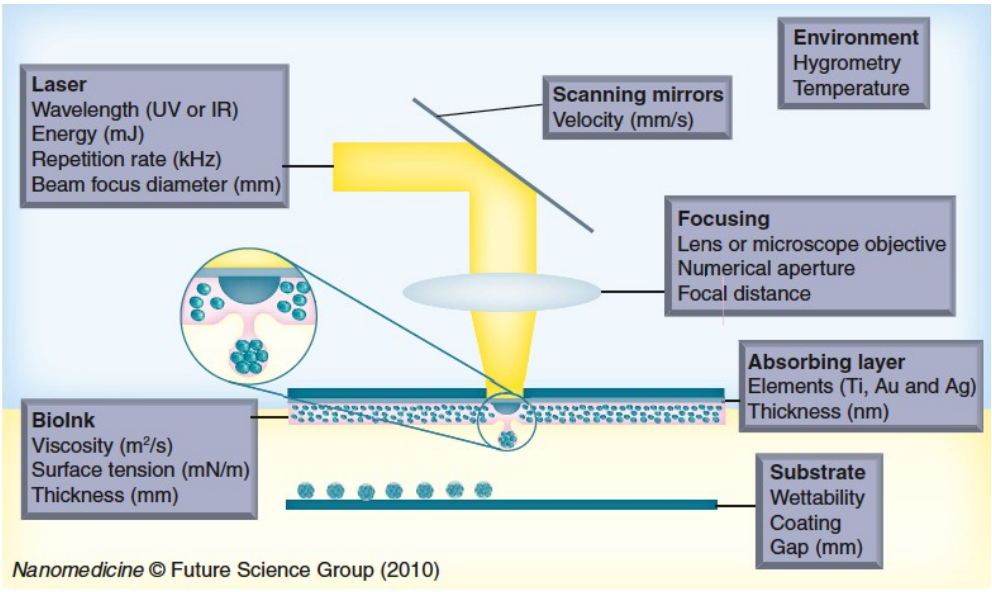


Figure 12: Paramètres impliqués dans le LAB

Le principe physique de l'éjection des gouttes par LAB a été décrit grâce à des modélisations confirmées par des observations expérimentales d'imagerie résolue en temps (Figure 16). Ce principe diffère peu entre les différentes méthodes de micro-impression d'éléments biologiques assistée par laser (100). Cinq étapes peuvent être identifiées dans cette séquence:

- **Dépôt de l'énergie laser**

  L'absorption de l'énergie d'une impulsion laser a pour conséquence la vaporisation de la section de la couche transductrice traversée par le laser (Bio-LP) ou des premières couches moléculaires de l'encre (MAPLE-DW) qui donnent lieu à la formation d'une poche de gaz qui croît dans la direction de l'impulsion laser.

- **Croissance de la poche de gaz dans l'épaisseur du film d'encre**

  La deuxième étape concerne la croissance de la bulle dans l'épaisseur du film d'encre. Il a été démontré au laboratoire que la cinétique de la croissance de la bulle était liée aux conditions d'énergie laser ainsi qu'à la viscosité de l'encre (126).

- **Interaction de la poche de gaz avec la surface libre (interface encre/air)**

  A mesure que la bulle croit, elle déforme la surface libre du film d'encre et son expansion n'est plus seulement gouvernée par les paramètres évoqués précédemment, mais aussi par les forces liées à la tension de surface. Lorsque les forces de la tension de surface permettent de contenir l'expansion de la bulle, il est observé un effondrement de la bulle qui donne lieu à la formation d'un jet. Dans le cas contraire, la bulle explose et de multiples gouttelette sont éjectées de façon incontrôlée. De là, quatre paramètres régissant l'éjection de micro-gouttelettes peuvent être isolés: énergie de l'impulsion laser, épaisseur du film, viscosité et tension de surface de l'encre. En fonction de la combinaison de ces paramètres, deux seuils peuvent être isolés, donnant

lieu à trois régimes (127):

- **<u>Le régime “sous seuil“ (Subthreshold Regime)</u>** n'entraîne pas d'éjection de goutte car la déformation de la bulle est trop faible pour atteindre la surface libre. Cependant, la surface libre est légèrement déformée et il est possible d'obtenir des impressions par contact direct entre l'encre et le substrat receveur si l'entrefer est faible (inférieur à 100 µm: mode contact) (Figure 13).

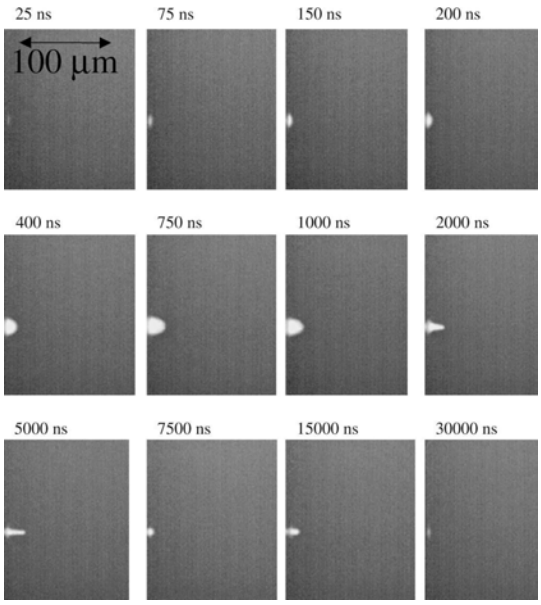


Figure 13: Exemple d'éjection en régime “Sous Seuil“; Fluence = 19mJ/cm^2; L'énergie laser provient de la gauche et le jet est projeté vers la droite de la figure; D'après(127)

- **<u>Le régime de “jet“ (Jetting Regime)</u>** qui conduit au transfert de matière depuis la lame donneuse vers le substrat receveur, sous la forme d'un jet de diamètre inférieur au diamètre du spot laser et dont la vitesse atteint 50 à 100 m/s. Lorsque l'énergie laser est très élevée et/ou que la viscosité de l'encre est faible, la vitesse d'éjection de la goutte est plus élevée, ce qui peut conduire à la formation de gouttes aux contours mal définis (éclaboussures: “splashing“) sur le substrat receveur (Figure 14).

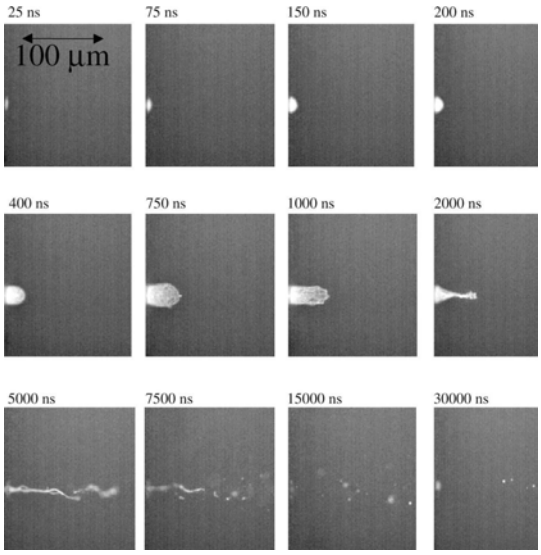


Figure 14: Exemple d'éjection en régime de “Jet“; Fluence = 32 mJ/cm2; d'après (127)

- **<u>Le régime par “explosion“ (Plume Regime):</u>** conduit à la rupture violente de film d'encre qui précède l'éjection de multiples gouttelettes satellites qui vont se déposer sur le substrat receveur (Figure 15).

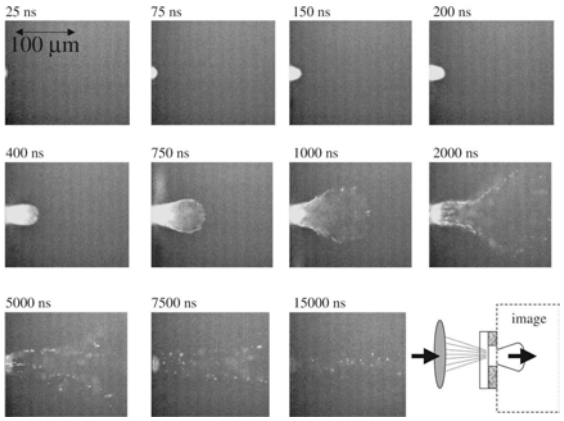


Figure 15: Exemple d'éjection en régime “Explosion“ Fluence = 65 mJ/cm2; Imagerie Résolue en temps, d'après (127)

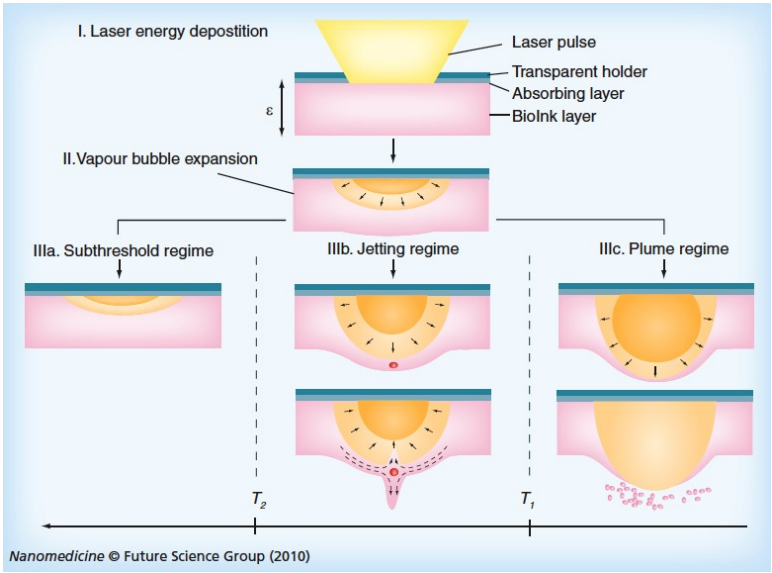


Figure 16: Mécanisme d'éjection des gouttes et régimes d'impression

- **Les caractéristiques du jet**

  L'imagerie résolue en temps de liquides imprimés par LAB a permis de montrer la formation d'un jet long (jusqu'à 5 mm) en direction du substrat receveur (128). En fonction des propriétés rhéologiques de l'encre et de l'énergie du laser, la vitesse du jet a été mesurée entre 20 et 150 m/s.

- **Dépôt de la goutte sur le substrat receveur**

  La dernière étape de l'impression est le dépôt de la goutte éjectée sur le substrat. Comme nous l'avons vu plus haut, l'énergie cinétique du jet a une influence sur la morphologie de la goutte déposée. Les propriétés de surface du substrat receveur ont également un effet important sur la morphologie des gouttes puisque la tension de surface peut favoriser ou limiter l'étalement des gouttes sur la surface.

3.3. Applications du LAB pour l'ingénierie tissulaire

a) Impression de Cellules

Plusieurs études antérieures se sont intéressées à l'impression de cellules diverses par laser avec des montages expérimentaux différents et des encres de composition variées (Tableau 4).

Le plus souvent, des lignées cellulaires ont été utilisées, mais récemment des équipes ont réalisé des impressions par Bio-LP avec des cellules primaires (120,129,130). Les résultats ont montré une viabilité importante indépendante du type cellulaire. Certaines études se sont spécifiquement intéressées à l'influence de l'énergie du laser sur la viabilité et ont montré que la viabilité diminuait avec l'augmentation de l'énergie utilisée (131-133).

L'encre était le plus souvent composée d'une solution de milieu de culture pour suspendre le culot cellulaire. L'ajout de glycérol, d'alginate, ou de méthyl cellulose ou ont été décrits pour limiter l'évaporation des solutions.

L'étalement d'un matelas d'hydrogel sur la lame receveuse pour amortir les contraintes liées à l'atterrissage des cellules est presque systématique. Il s'agit le plus souvent de Matrigel®, mais certains ont également utilisé la gélatine ou l'alginate.

Référence	Cellules	Montage expérimental Laser Couche absorbante	Encre de Cellules	Hydrogel sur Lame Receveuse	Suivi des Cellules
(134)	MG63 CRL 1765	MAPLE-DW 193 nm, 20 ns	2 à 100.10^6 Cellules/ml Milieu Culture + 5% Glycérol ou Matrigel*	Matrigel* 50 µm	100% viabilité (Live/Dead)
(131)	P19	MAPLE-DW 193 nm, 30 ns	15.10^6 Cellules/ml étalées sur Matrigel*	Matrigel* 10 à 100 µm	5 à 100% viabilité selon conditions expérimentales (Live/Dead)
(119)	MG63 EOMA	Bio-LP 266 nm, 3-5 ns 248 nm, 2.5 ns Au-Ti	10^8 Cellules/ml 50% DMEM 45% Sérum 5% Glycérol	Matrigel* 50 à 200 µm	Impression multi-couches
(123)	OEC (rat) Cellules épithéliales cristallin (porc)	AFA-LIFT 248 nm, 30 ns Ag	2 à 6.10^6 Cellules/ml Milieu de culture (?)	Gélatine	80 à 85% viabilité (Bleu Trypan)
(135)	MG63	Bio-LP 248 nm, 2.5 ns	1 à 20.10^7 Cellules/ml 50% DMEM 45% Sérum 5% Glycérol	Matrigel* 50 µm	100% viabilité (Live/Dead) Prolifération HSP
(136)	BAEC	Bio-LP 248 nm, 2.5 ns Au-Ti-TiO_2	10^8 Cellules/ml Milieu culture + 5% Glycérol	Matrigel* 100 µm Milieu de culture 500 µm	Environ 100% viabilité (Live/Dead) HSP pas modifiées par impression
(137)	B35	MAPLE-DW 193 nm	(?) Matrigel*+ Milieu de culture+10% sérum	Matrigel*	80 à 90% de viabilité Pas d'atteinte de l'ADN Phénotype conservé
(138)	B35	MAPLE-DW 193 nm, 30 ns Triazène	10.10^6 Cellules/ml Matrigel	Matrice Extracellulaire (ECM)	Impressions avec faible énergie Moins de mort cellulaire
(139)	MG63	MAPLE-DW 193 nm	10.10^6 Cellules/ml Milieu de culture	Matrice Extracellulaire (ECM)	Co-Impression avec HA: viabilité et prolifération
(140)	NIH3T3	LIFT 800 nm, 120 fs	1,5.10^6 Cellules/ml	(?)	80% Viabilité
(141)	AINV-15	LIFT 355 nm, 15 ns Polyimide	50% Glycérol + 50% milieu culture complet	Matrigel* 500 µm	Résolution et taille des gouttes en fonction de l'énergie du laser
(142)	OEC	BioLP 266 nm, 5 ns Ti, TiO_2	10^5 à 10^7 Cellules/ml Milieu de culture complet + 0,35% méthyl cellulose	Matrigel* 50 à 100 µm ou verre +Polylysine	Maintien phénotype après impression
(143)	BAEC, Fibroblates, myoblastes, cellules cancer sein, cellules nerveuses	MAPLE-DW 193 nm	(?)	(?)	Étalement cellules CAD-CAM
(132)	Levures (*Saccharomyces cerevisiae*)	MAPLE-DW 193 nm, 12 ns	4 à 5.10^8 Cellules/ml Milieu de culture	PBS	50 à 80% viabilité selon énergie (Bleu de méthylène)
(120)	NIH3T3 HaCaT MSC (ADSC, HBMSC)	LIFT 1064 nm, 8-9 ns Au	30 à 60.10^6 Cellules/ml Milieu de culture ou Plasma + Alginate	Milieu de culture ou Agarose ou Matrigel*	98% viabilité pour lignées 90% viabilité pour MSC (Live/Dead)
(133)	HT-29	MAPLE-DW 193 nm, 12 ns	1.10^7 Cellules/ml Milieu de culture	Milieu de culture	75 à 90% viabilité selon fluence (Bleu Trypan)
(129)	HBMSC Porc	LIFT 1064 nm, 10 ns Au	0,5 à 4.10^6 Cellules/ml Plasma + Alginate 2%	Alginate 1% gélifié par $CaCl_2$	Prolifération et différenciation des cellules
(98)	EC et MSC brebis	LIFT 1064 nm, 8-9 ns Au	2 à 4.10^6 Cellules/ml Plasma sanguin + Alginate	Scaffold de Polyéthylène glycol (PEG)	Pas d'évaluation de viabilité
(130)	HUVEC HUVSMC	Bio-LP 266 nm, 3-5 ns Au-Titane	10^6 à 10^7 Cellules/ml	Pas de matelas (?)	Organisation des cellules et prolifération
(144)	Fibroblastes peau (humain)	MAPLE-DW 193 nm, 8 ns	6.10^5 Cellules/ml Milieu de culture sur gélatine	Gélatine 10% (w/v) + Milieu de culture	Intérêt de la gélatine pour viscosité encre et couche absorbante

Tableau 4: Etat de l'art sur la micro-impression de cellules par laser

(?) Pas de renseignement sur ce point dans l'article

MG63: Lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome

CRL-1765: Cellules cardiaques de rat

P19: Cellules embryonnaires pluripotentes carcinomateuses

EOMA: Lignée de cellules endothéliales de souris

OEC: Cellules olfactives de rat (cellules de schwann et astrocytes)

BAEC: Cellules Endothéliales Bovines

B35: Lignée de cellules nerveuses tumorales de rat

NIH3T3: Lignée murine de fibroblastes

AINV-15: Lignée de cellules embryonnaire murines

HaCaT: Lignée humaine de kératinocytes

MSC: Cellules Mésenchymateuses

ADSC: Cellules Mésenchymateuses du tissu adipeux

HBMSC: Cellules Mésenchymateuses de la moelle osseuse

HT-29: Lignée de cellules cancéreuses du colon

EC: Cellules endothéliales

HUVEC: Cellules endothéliales humaines issues de cordon ombilical

HUVSMC: Cellules musculaires lisses humaines issues de cordon ombilical

b) Impression d'autres éléments biologiques

Plusieurs études ont montré qu'il était possible d'imprimer des solutions de protéines sans altérer leurs propriétés biologiques. Des anticorps spécifiques ont montré que la structure des protéines imprimées n'était pas modifiée (145). Les propriétés enzymatiques de la phosphatase alcaline ont également été conservées (146) et la structure de doubles brins d'ADN n'a pas été modifiée après l'impression par LAB (131,147).

Il existe une étude qui présente des impressions de phosphates de calcium par LAB (139). Les auteurs ont utilisé une encre composée d'une poudre d'hydroxyapatite ou de zircone avec des cellules MG63. Après impression, la survie et la prolifération des cellules ont été observées. Cependant, la résolution est assez faible (500µm) et les 2 composants de l'encre (HA et Cellules MG63) n'ont pas été imprimées de façon indépendante.

Avec des solutions sans cellules (hydrogels), les gouttes imprimées peuvent atteindre des volumes de l'ordre de quelques femtolitres et d'une dizaine de microns de diamètre (148). Cependant, les diamètres obtenus avec des encres de cellules sont plus importants, de l'ordre de quelques dizaines de µm, ce qui reste une résolution cohérente pour des applications en ingénierie tissulaire.

4. OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif général de ce travail était d'élaborer *in vitro* un assemblage cellulaire structuré tridimensionnel par LAB et d'évaluer *in vivo* chez la souris son effet sur la réparation osseuse par rapport à un matériau témoin non structuré. En effet, le postulat de départ du Bioprinting affirmant qu'une organisation couche par couche tridimensionnelle des éléments constitutifs d'un tissu artificiel favoriserait son intégration n'a jamais été réellement démontré.

Les objectifs secondaires étaient liés à des problématiques technologiques de développement du LAB et de mise au point des protocoles d'impression pour l'ingénierie tissulaire osseuse:

- ✔ Il fallait tout d'abord maîtriser et développer la technologie d'impression assistée par laser. En effet, certains paramètres de la station de travail ont dû être adaptés pour améliorer l'ergonomie et permettre de nouvelles applications du LAB, comme par exemple l'impression *in vivo* de nHA chez la souris.
- ✔ Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse, plusieurs « briques élémentaires » de l'os ont été définies et des encres spécifiques ont été préparées et imprimées séparément. L'hydroxyapatite nano-cristalline a été choisie comme élément non-organique de l'os et plusieurs types cellulaires ont été utilisés pour les assemblages. Il s'agissait de cellules de lignée pour les premiers tests (MG63 et Eahy926) puis de cellules humaines souches mésenchymateuses (ADSC) ou de cellules mésenchymateuses induites vers un phénotype ostéoblastique (HOP). Les encres devaient avant tout être biocompatibles et répondre à des caractéristiques rhéologiques particulières pour être utilisées par LAB. Ensuite, pour chaque encre, il fallait définir des protocoles d'impression permettant le maintien des propriétés physico-chimiques et/ou biologiques des éléments imprimés.
- ✔ Le choix du support d'impression (receiving substrate) avait également une importance capitale sur la résolution des gouttes imprimées, mais aussi sur la viabilité cellulaire après impression. Ainsi le support d'impression devait être choisi en fonction de l'encre utilisée.
- ✔ Après avoir déterminé les conditions d'impression en 2 dimensions, il a fallu mettre au point des protocoles d'impression 3D afin de réaliser des matériaux implantables *in vivo*. Plusieurs méthodes ont été testées avec des encres concentrées ou des membranes fines superposées (biopapers).
- ✔ Enfin, pour mener à bien ce travail, il a été nécessaire de développer des modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* spécifiques pour caractériser les échantillons imprimés.

MATERIEL ET METHODES

Nous présentons dans cette partie les matériels et méthodes qui ont été utilisés dans ce travail. Il s'agit tout d'abord de la description du montage expérimental utilisé pour les impressions par laser, puis des méthodes de préparation des encres (hydroxyapatite, cellules). Enfin, les méthodes de caractérisation physico-chimiques, biologiques et d'imagerie utilisées au cours de ce travail sont détaillées.

1. Montage expérimental pour la Micro-impression d'éléments biologiques par laser (LAB): Station de travail LASIT

Une station de travail dédiée à l'impression laser d'éléments biologiques (Station LASIT: Laser pour l'ASsemblage en Ingénierie Tissulaire) a été développée au laboratoire en 2007 Figure 17. La station de travail a été conçue de façon à permettre une utilisation simple pour des personnes non initiées avec le maniement de tables de lasers.



Figure 17: Prototype LASIT

1.1. Source Laser, Focalisation et Scanners

La source était un laser solide Nd:YAG situé dans l'infra rouge (longueur d'onde λ=1064 nm) avec une durée d'impulsion τ=30 ns et un taux de répétition f=1 à 100 kHz. . Les paramètres de qualité du faisceau étaient la divergence (q= 3:4 mrad), le mode spatial ($TEM00_{)}$) et la stabilité des impulsions (ptp=< 1,5% rms). Enfin, la puissance laser moyenne était de 7W. (Navigator 1, Newport Spectra Physics)

Le système de scanners était composée de 2 miroirs galvanométriques (SCANgine 14, ScanLab), qui permettait d'atteindre des vitesses de scanner de 2000 mm/s. De plus, une lentille optique à large focale permettait de focaliser le laser sur la lame donneuse (S4LFT, Sill Optics, France) (F = 58 mm). Les rôle des scanners était de diriger précisément et avec une vitesse de déplacement importante le faisceau laser en surface de la lame donneuse, afin d'imprimer des motifs avec une haute résolution et une vitesse élevée.

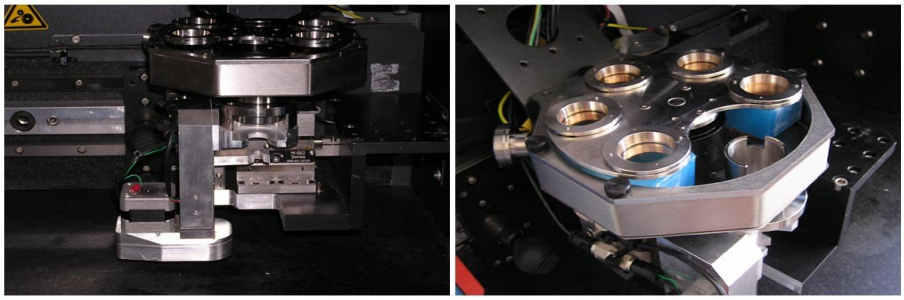
Une caméra CCD à haute résolution était utilisée pour ajuster le plan focal sur la lame donneuse et permettait également d'ajuster la position de la lame receveuse. L'objectif de la caméra était placé juste au-dessus du trajet optique des scanners.

1.2. Carrousel et Platines Motorisées

Le carrousel permettait de charger jusqu'à 5 échantillons, soit 5 « cartouches » d'encres différentes. Ce carrousel avait une résolution angulaire de 1°. La translation du caroussel était pilotée par des platines motorisées micrométriques dans les 3 axes de l'espace (x, y et z). La résolution était de 1µm dans les axes X et Y et de 5µm suivant l'axe Z (Newport®), (Figure 18).

Le carrousel et les platines de translation en x, y et z étaient placées sur un axe vertical qui permettait de modifier la distance entre la lame donneuse et la lame receveuse (l'entrefer). Il était également possible de faire varier les conditions de focalisation du laser sans modifier

l'entrefer.
L'amplitude maximale des platines était de 5 cm selon l'axe X, de 5 cm selon l'axe Y et de 5 cm selon l'axe Z.



a b

Figure 18: Vue des platines motorisées de la station de travail

1.3. Interface informatique

L'objectif était d'imprimer un motif d'éléments biologiques sur un substrat receveur par transfert depuis une lame donneuse (cartouche). Plusieurs étapes de programmation du logiciel étaient nécessaires:

- Le positionnement de la lame donneuse et le substrat receveur l'un par rapport à l'autre dans l'espace de la machine. Ce positionnement se faisait dans les trois dimensions de l'espace (x, y, z);
- Le choix du motif à partir de modèles géométriques ou d'images importées (format .bmp);
- Le choix des paramètres du laser pour le traçage du motif (Energie, Fréquence, Vitesse des scanners, Entrefer);
- Le déplacement de la lame donneuse par rapport à la lame receveuse et la répétition éventuelle de plusieurs “Outils“.

La logique de programmation de la station de travail était donc de créer d'abord un “Outil“ (motif, paramètres laser) puis un “Process“ (positionnement tridimensionnel du motif, nombre de répétitions de l'outil ou des outils choisis précédemment).

Le logiciel de pilotage des différentes étapes de l'impression a été développé grâce aux logiciels Delphi® et Solidworks®. Le développement de la machine a été faite conjointement avec la société Novalase (Canéjan).

La page d'accueil du logiciel comprenait une zone centrale qui affichait les acquisitions de la caméra. Cela permettait de choisir la zone d'impression ou bien de réaliser le réglage du plan de focalisation. Le bandeau inférieur permettait d'effectuer les réglages des platines dans les 3 dimensions de l'espace. L'éclairage de l'enceinte était piloté au niveau du bandeau supérieur. Le bandeau de droite donnait accès aux fonctions de choix des outils ainsi qu'au lancement des impressions (Figure 19).

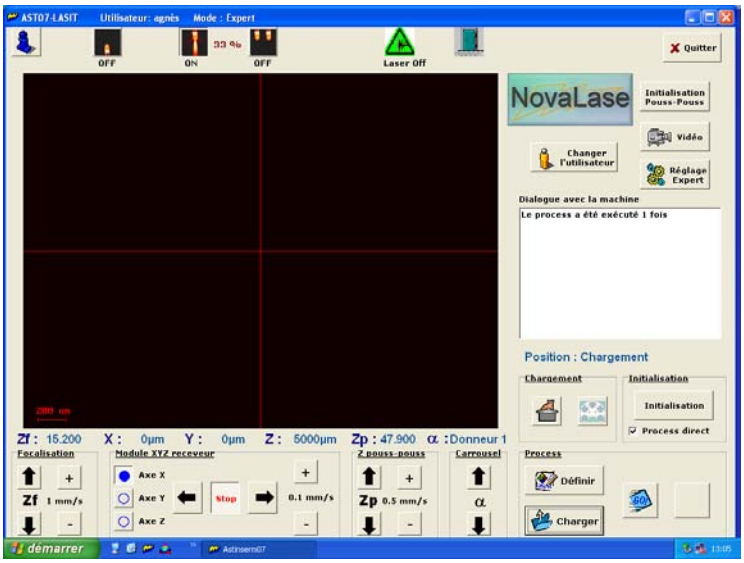


Figure 19: Fenêtre d'accueil du logiciel

La première étape consistait à déterminer le nombre et la position des lames donneuses sur le carrousel (jusqu'à 5 lames donneuses). Il fallait également déterminer à ce moment l'espace entre les 2 lames (entrefer) (Figure 20).

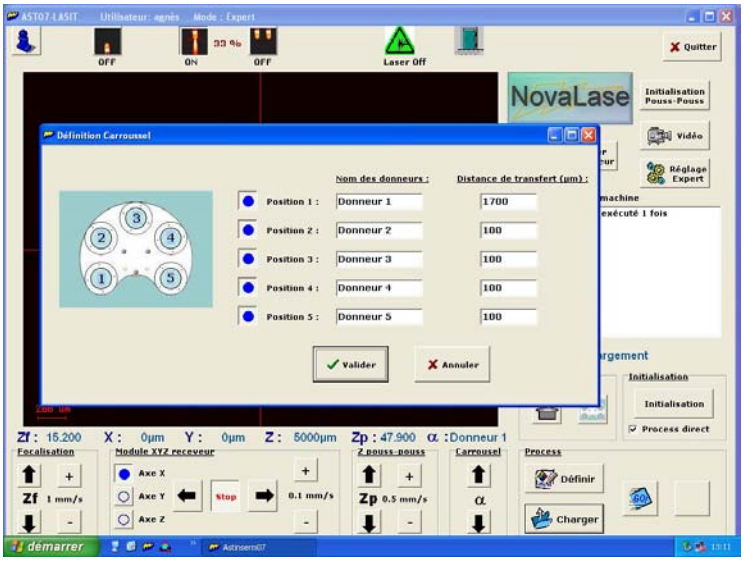


Figure 20: Détermination du nombre et de la position des lames donneuses

La seconde étape consistait à déterminer “l'Outil“: il s'agissait de déterminer les paramètres laser (puissance, fréquence, ouverture du diaphragme, vitesse des scanners) et le motif choisi (cercle, rectangle, droites, import d'images .bmp) (Figure 21).

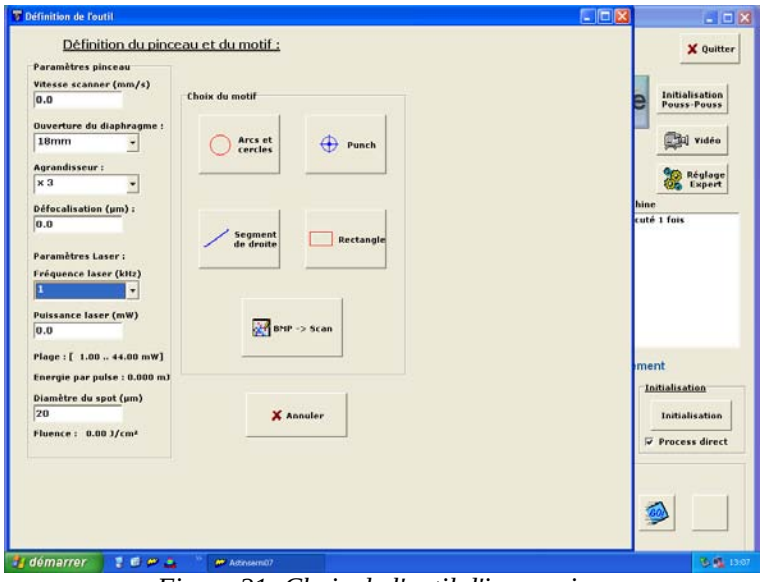


Figure 21: Choix de l'outil d'impression

Enfin, la dernière étape avant le lancement de l'impression consistait à déterminer la trajectoire, c'est à dire le nombre de répétitions des “Outils“ et leur agencement dans l'espace (Figure 22).

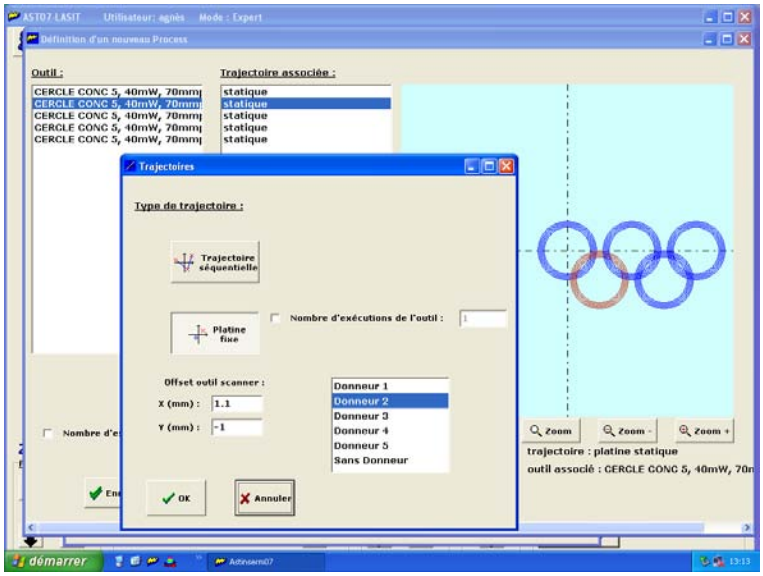


Figure 22: Détermination de la trajectoire d'impression

Après le paramétrage de l'impression (outils, process), ces éléments étaient enregistrés dans un dossier spécifique et pouvaient ainsi être réutilisés d'une séance sur l'autre. Il suffisait donc de charger son “Process“ et de lancer la procédure après avoir placé les lames donneuses et receveuses en place dans la machine.

1.4. Préparation des lames donneuses (« Ribbon »)

a) Dépôt de la couche métallique absorbante

Les lames donneuses étaient nettoyées à l'eau savonneuse pour les dégraisser avant la métallisation. Ensuite, une couche métallique de 50 à 60 nm, absorbante pour le laser infra rouge, a été déposée sur les lames donneuses grâce à un évaporateur sous vide. La calibration

des paramètres de l'évaporateur a été faite grâce à des mesures en profilométrie optique de dépôts d'Or ou de Titane sur des lames de verre. L'Or était déposé avec un évaporateur Emscope SC500 et le Titane était déposé avec un évaporateur TB Sputter (Quorum Technology).

b) Stérilisation et nettoyage des lames donneuses

Les lames recouvertes de leur couche métallique absorbante étaient stérilisées au Poupinel pendant 12 heures à 120°C.

c) Étalement de l'encre cellulaire sur la lame donneuse

L'encre de cellules était étalée avec une raclette micrométrique (doctor blade®) ou bien manuellement avec l'embout de la micropipette (Figure 23).
L'épaisseur de la couche donneuse était comprise en général entre 20 et 30µm. Elle était ajustée soit grâce à la vis micrométrique de réglage de la raclette, soit en modifiant le volume déposé sur la lame donneuse.

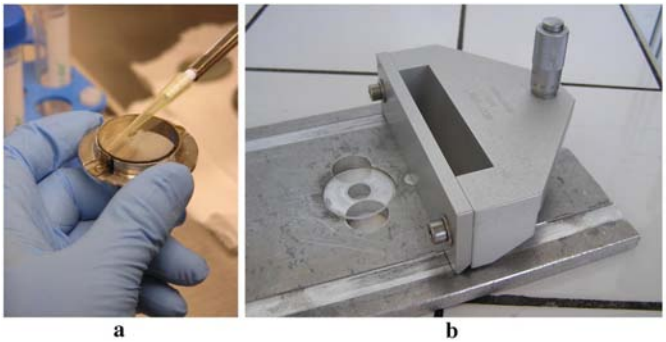


Figure 23: Méthodes de préparation de la couche d'encre sur la lame donneuse (a: Etalement au doctor blade; b: Etalement à la micro-pipette)

d) Conditions d'impression

Les impressions étaient réalisées en atmosphère humide et fraiche afin de limiter les phénomènes d'évaporation et de séchage de la lame donneuse. La pièce était climatisée à 15°C et de la glace pilée était placée dans l'enceinte d'impression et sous la hotte de culture lors de la préparation des lames donneuses.
Pour éviter les contaminations, les lames étaient manipulées sous la hotte de culture cellulaire en conditions stériles. Après étalement de la couche donneuse, les lames étaient placées dans des boites de pétri stériles avant leur transfert vers la station de travail.

1.5. Préparation des lames « receveuses » (Substrate)

Les lames receveuses étaient en verre et elles mesuraient 3 cm de diamètre et 1,5 mm d'épaisseur. Elles pouvaient être recouvertes d'une couche d'hydrogel avant les impressions.

a) Verre

De façon générale, les lames étaient nettoyées à l'alcool à 70°C avant utilisation. Dans le cas des impressions de cellules, les lames de verre étaient stérilisées au Poupinel pendant 12 heures à 120°C.

b) Matrigel®

Présentation et dilution

Le Matrigel® (BD Bioscience) est utilisé sous 2 conditionnements différents (8 mg/ml ou 20 mg/ml). Il a été dilué avec du milieu DMEM pour obtenir une solution concentrée à 4 mg/ml et maintenu congelé avant utilisation. Le Matrigel® gélifie à température ambiante, il doit donc être manipulé sur glace.

Etalement du Matrigel sur les lames receveuses

La solution de Matrigel® était étalée sur les lames receveuses juste avant les impressions. Le volume était choisi en fonction de l'épaisseur de matelas désiré. Les épaisseurs utilisées couramment sont de 100 µm environ. Après l'étalement de la solution sur la lame, celle-ci était placée 5 minutes à l'étuve à 37°C pour permettre la gélification de l'hydrogel.

c) Agarose

L'agarose a été utilisé pour empêcher l'adhésion des cellules sur la surface de verre. Une solution d'agarose à 2% (w/v) était réchauffée au micro-ondes pendant 3 minutes, avant de l'étaler sur la lame receveuse. Les lames étaient refroidies à température ambiante pendant 10 minutes pour gélifier l'agarose.

d) Membranes de Polycaprolactone (PCL) préparés par « électrospinning »

Dans certaines expériences, nous avons utilisé des membranes de PCL tissées par électrospinning comme support d'impression de cellules afin de réaliser des impressions en couches superposées. Le principe général de la méthode d'électrospinning est de fabriquer à l'aide d'un champ électrique des fibres dont l'épaisseur et le diamètre sont contrôlées (Page 31).
Les membranes de PCL ont été réalisées dans le laboratoire de régénération tissulaire (Department of Tissue Regeneration) de l'université de Twente aux Pays-Bas et nous les avons utilisées dans le cadre d'une collaboration entre cette structure et notre laboratoire. Les détails de préparation sont exposés en annexe (Page 147).

Avant utilisation, les membranes ont été découpées avec un emporte pièce (5 ou 10 mm de diamètre), puis elles ont été stérilisées aux UV pendant 10 minutes (2x5 minutes). Ensuite, elles ont été manipulées avec des pinces fines stériles pour les impressions de cellules et les implantations *in vivo*. Pour les impressions de cellules *in vitro*, les membranes de PCL étaient placées sur la lame receveuse après étalement de 20µl de milieu de culture ou 100µl de Matrigel® sur la lame de verre.

2. PRÉPARATION D'UNE ENCRE D'HYDROXYAPATITE NANO-CRISTALLINE

2.1. Synthèse de nHA par précipitation humide

L'hydroxyapatite nano-cristalline a été synthétisée par précipitation humide selon la méthode de Afshar et Coll (149). Cent ml d'une solution d'acide phosphorique (H_3PO_4) à 0,6 M ont été ajoutés goutte par goutte à cent ml d'une solution molaire (1M) d'hydroxyde de calcium ($Ca(OH)_2$) sous agitation constante et à température ambiante. La réaction a duré environ 30 minutes puis le pH a été ajusté à 10 grâce à l'ajout de 0,5 mmol d'une solution de soude (NaOH) à 0,6M. Ensuite l'agitation a été poursuivie pendant 12 heures.

Pour les caractérisations morphologiques, structurales et physico-chimiques, la suspension a été filtrée, puis la poudre obtenue a été ensuite déshydratée à l'étuve (70°C) pendant 24 heures ou lyophilisée pendant 12 heures (HETO Power Dry LL1500).

2.2. Caractérisations Morphologiques, Structurales et Physico-Chimiques

La caractérisation morphologique a été réalisée par des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) et par microscopie électronique à transmission (MET). La caractérisation structurale a été faite par Diffraction des Rayons X (DRX) et la caractérisation physico-chimique a été faite par spectroscopie infra rouge (FTIR).

a) Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un MEB S-2500, Hitachi (Japon) équipé d'une pointe LaB6. Les échantillons ont été déshydratés dans des solutions d'alcool de concentration croissante puis par un dernier bain d'hexamethyldisilazane. La surface des échantillons a été métallisée par une couche de quelques nm d'or avec un évaporateur (Emscope SC500) avant observation. La tension d'accélération était comprise entre 10 et 20 kV selon la résolution recherchée et les images ont été numérisées avec le logiciel MaxView®.

b) Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Les observations au MET ont été réalisées dans un premier temps au Service Commun de Microscopie (Sercomi) de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2 (Philips TECNAI 12). Ensuite, une seconde série d'observations a été menée au CREMEM Centre de Ressources en Microscopie Electronique et Microanalyse – Université Bordeaux 1) afin de bénéficier de l'analyse élémentaire par microanalyse X (JEOL TEM 200 FX).

Dans le cadre de ce travail, les échantillons observés étaient uniquement des nanoparticules d'hydroxyapatite. Une goutte de la solution de nHA a été déposée sur une grille carbonée puis a été placée à l'étuve (70°C) pendant 24 heures avant observation.

c) Diffaction des Rayons X (DRX)

Les observations ont été réalisées dans le service de diffraction des rayons X à l'ICMCB (Institut de Chimie de la Matière condensée), à l'université Bordeaux 1 (Pessac). L'appareillage utilisé était un Diffractomètre de poudre PANalytical X'Pert Pro avec rayonnement monochromatique Cu Kα1.

Les échantillons ont été analysés sous forme de poudre. Les résultats ont été analysés grâce au logiciel DIFFRACplus® (Bruker AXS) par comparaison aux tables de référence J.C.P.D.S. (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

d) Spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Un spectromètre FTIR 460 Plus (Jasco) a été utilisé en mode ATR et en transmission.
Une autre série d'expérimentations a été réalisée sur un spectromètre Thermo Nicolet NEXUS 670 à l'IECB (Institut Européen de chimie et de biologie, Pessac).
Les échantillons ont été analysés soit sous forme de poudre pure (mode ATR) ou bien après inclusion dans des pastilles de Bromure de Potassium (KBr) (Mode Transmission).
Les résultats ont été interprétés grâce à des tables spécifiques et par référence à des publications antérieures.

2.3. Evaluation de la biocompatibilité de la nHA

La biocompatibilité de la nHA a été évaluée sur poudre après déshydratation du matériau par chauffage, suivi d'un broyage au mortier.
Une étude *in vitro* a été réalisée en cultivant des cellules MG63 pendant 3 ou 6 jours sur le matériau. La viabilité des cellules a été évaluée par Live/Dead, leur morphologie a été observée par MEB et leur phénotype a été caractérisé par la coloration à la Phosphatase alcaline (PAL).
Le matériau a ensuite été testé *in vivo* après implantation dans des défauts de calvaria latéraux chez la souris C57 Black pendant 1 ou 3 mois. Des colorations HES sur coupes décalcifiées et au vert lumière sur coupes calcifiées ont été réalisées après sacrifice pour évaluer l'intégration du matériau et la réparation osseuse.

2.4. Préparation de l'encre de nHA

L'encre d'hydroxyapatite nano cristalline (nHA) a été préparée à partir de la solution synthétisée par précipitation humide. Cette solution était laissée 24h à 4°C pour laisser les particules sédimenter. Ensuite, le surnageant était retiré à la pipette afin d'obtenir une concentration en nHA de 10% (poids/volume).
La solution de nHA était utilisée soit pure, soit supplémenté avec 30% de glycérol (volume/volume) afin d'augmenter la viscosité et de diminuer la vitesse d'évaporation de l'encre.

L'encre de nHA était étalée sur la lame donneuse soit manuellement (avec une micropipette), soit à l'aide d'une raclette micrométrique (« Doctor Blade ») (Figure 23).

Pour augmenter la concentration de l'encre sur la lame donneuse, l'étalement pouvait se faire en 2 étapes: une première couche était étalée puis séchée par évaporation. Ensuite une seconde couche était étalée sur la première couche sèche juste avant l'impression.
Il était nécessaire de synthétiser la solution extemporanément car des agrégats se formaient rapidement après la synthèse et empêchaient l'étalement d'une couche homogène de solution sur la lame donneuse.

3. PRÉPARATION D'ENCRES DE CELLULES

3.1. Culture Cellulaire

Plusieurs types cellulaires ont été utilisés dans ce travail. Il s'agissait de 2 lignées humaines (MG63 et Eahy926) et de 2 cultures primaires humaines. Certaines cellules ont été transfectées par la luciférase ou par des marqueurs fluorescents (GFP ou Td Tomato) pour permettre leur suivi après impression.

a) MG63

Les cellules MG63 sont des cellules de lignées humaines issues d'ostéosarcome (ATCC: CRL 1427™) (150). Le milieu de culture utilisé était de l'IMDM (Iscove Modified Dulbecco's Medium, GIBCO, InVitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplémenté à 10% (v/v) avec du sérum de veau foetal (SVF). Les cellules ont été ensemencées à 10000 cellules par cm^2 et incubées en atmosphère humide à 5% de CO2 et à 37°C. Le milieu était changé tous les 3 à 4 jours. Pour les études *in vitro* d'évaluation de la biocompatibilité de la nHA, l'ensemencement sur le matériau a été fait avec 2 concentrations différentes (20000 et 50000 cellules/cm^2).

Des cellules MG63 ont été par ailleurs transfectées par le gène de la luciférase afin de suivre leur prolifération *in vitro* et *in vivo* (Annexe, page 148).

b) Ea hy926

Les cellules Ea hy 926 sont des cellules humaines endothéliales de lignée, issues de cordon ombilical et immortalisées (ATCC: CRL 2922™).
Elles ont été cultivées dans du milieu IMDM supplémenté avec 10% de SVF (v/v) et incubées en atmosphère humide à 5% de CO2 et à 37°C. Le milieu était changé tous les 3 à 4 jours.

c) Cellules Ostéoprogénitrices humaines: Human Osteo Progenitors (HOPs)

Les cellules HOPs ont été isolées à partir de cellules de moelle osseuse humaine selon le protocole décrit en annexe (Page 147). La culture cellulaire a été faite en atmosphère contrôlée (37°C, 5% CO2) avec du milieu IMDM supplémenté avec 10% de SVF qui était changé tous les 3 à 4 jours.

d) Cellules mésenchymateuses issues de tissu adipeux: Adipose Derived Stromal Cells (ADSC)

L'isolement des cellules ADSC est décrit en annexe (Page 148). La culture cellulaire a été faite en atmosphère contrôlée (37°C, 5% CO2) avec du milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% de SVF qui était changé tous les 3 à 4 jours.

Plusieurs lots de cellules ADSC ont été utilisées dans ce travail. Il s'agissait soit de cellules ADSC non transfectées, soit de cellules transfectées par le gène de la protéine GFP, soit de cellules transfectées par le gène de la protéine td-Tomato, soit de cellules transfectées par le gène de la luciférase. Les protocoles de transfection sont décrits en annexe (Page 148).

3.2. Préparation de l'Encre de cellules

a) Ajustement de la concentration cellulaire

Les cellules ont été trypsinées (Trypsine 0,125% w/v + 2 mM EDTA), rincées une fois dans du PBS 1X (GibCo®) et comptées.

Après centrifugation (2000G, 5'), le surnageant a été éliminé puis le volume du culot a

été mesuré avec une micropipette.

En fonction de la concentration cellulaire choisie, le volume adéquat de milieu IMDM, sans sérum, a été ajouté au culot cellulaire, après avoir mesuré et retranché le volume du culot.

b) Supplémentation de la solution par de l'alginate

Une solution d'alginate de Sodium a été utilisé pour augmenter la viscosité de la solution. La poudre d'alginate (FMC Biopolymer, Protanal 10/60, Norway) a été purifiée avant utilisation selon le protocole suivant:

- Préparation une solution d'alginate à 1% (w/v) sous agitation
- Dialyse de la solution d'alginate contre de l'eau distillée avec une membrane MWCO 3500
- Ajout de 0,5g de charbon dans la solution dialysée et agitation pendant 3 minutes. Arrêter l'agitation lorsque le charbon est déposé au fond du flacon et centrifuger pour éliminer le charbon
- Congélation de la solution puis lyophilisation le matériau
- Pesée de l'alginate lyophilisé et vérifier l'efficacité de la procédure ainsi que la perte de de matériau résultant de la purification
- Stockage l'alginate purifié à -80°C

Avant utilisation, l'alginate lyophilisé a été solubilisé dans du milieu de culture (DMEM) à une concentration de 2% (poids/volume). Il a ensuite été dilué dans la solution comprenant l'encre de cellules pour obtenir la concentration voulue. Les concentrations d'alginate utilisées pour les impressions de cellules étaient de 0.5% ou 1% (volume/volume).

c) Antibiotiques

Des antibiotiques (Pen Strep, Gibco, Invitrogen, USA) étaient utilisés à 1/1000 pour la culture des cellules après impression.

4. MÉTHODES DE CARACTÉRISATION EN BIOLOGIE

4.1. Méthodes de coloration et de marquage des cellules

a) Coloration au Live/Dead

Cette technique a été utilisée pour évaluer la viabilité des cellules en culture ou après impression. Dans les cellules vivantes, le substrat non fluorescent (acétoxyméthyl calcéine: AM) est clivé par une estérase intracellulaire en calcéine fluorescente verte. Les cellules mortes, dont les membranes sont lésées, laissent entrer l'homodimère-1 d'éthidium (ETD-1) qui s'intercale entre les bases de l'acide nucléique, ce qui a pour conséquence une amplification de la fluorescence rouge.
Le kit Live/Dead Assay (Molecular Probes, Invitrogen, France) a été utilisé selon le protocole conseillé par la fabriquant: Pour 2 ml de milieu complet (IMDM + 10% SVF) ou de solution de Hank's (HBSS 1X, GIBCO®), 2µl de Calcéine (Calcein-AM) et 4 µl d'ethidium homodimer (EthD-1) ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été incubés 20 minutes à l'incubateur (37°C, 5% CO_2), puis ils ont été rincés (solution de Hank's) avant l'observation.

Les observations ont été réalisées avec un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 80i) avec les filtres suivants: Calcéine: Filtre d'excitation 465-495 nm / Miroir Dichroïque: 505 nm / Filtre d'émission: 515-555 nm. Ethidium Homodimer-1: Filtre d'excitation 540-580 nm / Miroir Dichroïque: 595 nm / Filtre d'émission: 600-660 nm.

b) Coloration des noyaux cellulaires au Hoechst

La coloration Hoechst 33342 est une technique qui permet de visualiser la morphologie des cellules par marquage de leur noyau.
Le marquage a été réalisé avec le kit Hoechst 33342 de Sigma-Aldrich® (France) (25 µg/ml). Les observations ont ensuite été réalisées sur un microscope à fluorescence.

c) Test au MTT

Le test au MTT permet d'évaluer la quantité de cellules vivantes sur un échantillon.

Le MTT (Bromure de 3-(4-5 diméthylthiasol-2-yl) diphényl tétrazolium) est un sel de tétrazolium de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est réduit en cristaux bleus de formazan par les succinates déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. La quantité de formazan générée par les cellules après leur incubation avec le MTT est directement liée à leur activité métabolique.

Pour effectuer ce test, les cellules ont été immergées dans la solution de MTT (5mg/ml dans du PBS 0.1M pH 7.4) diluée au 1/5 dans le milieu DMEM sans rouge phénol (Dulbecco's Medium) à raison de 125 µl par puits. Ensuite les cellules ont été incubées 3h à 37°C, lysées à l'aide de 100 µl de DMSO pur, puis l'intensité de la coloration a été lue au spectrophotomètre (MRX-Dynex) à la longueur d'onde de 540 nm.

d) Marquage de la Phosphatase Alcaline

La phosphatase alcaline est un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique.

L'activité de la phosphatase alcaline intracellulaire a été révélée dans les cellules par l'interaction du produit d'hydrolyse insoluble du substrat naphtol-ASMX-phosphate avec un sel de diazonium (fast-blue R-R) pour former un azodérivé insoluble et coloré qui reste

localisé sur le site d'activité enzymatique. Les cellules présentant cette activité montrent des granulations cytoplasmiques bleu-violacé. Le kit ALP, Sigma Aldrich a été utilisé. Les observations ont ensuite été réalisées sur un microscope à transmission en lumière blanche.

e) Immuno-marquage de l'Ostéocalcine dans les cellules

L'ostéocalcine est un marqueur tardif de la différenciation ostéoblastique.
Le kit Histostain® SP Invitrogen LAB-SA a été utilisé pour le marquage de l'ostéocalcine dans les cellules.
Les cellules ont d'abord été fixées au méthanol (10 minutes, 4°C) et rincées 3 fois au PBS 1X. Ensuite, les échantillons ont été incubées pendant 1 heure à 37°C avec 5% de BSA (Bovin Serum Albumin, Eurobio, USA) pour la saturation des sites non spécifiques puis ils ont été rincés au PBS 1X. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps monoclonal anti-ostéocalcine (OCG2 Takara Bioinc®) dilué a 1/100^{e}. Après rinçage au PBS (3 fois 5 minutes), les échantillons ont été mis en contact avec le second anticorps biotinylé pendant 10 minutes puis rincés trois fois au PBS. Enfin, les échantillons ont été incubés avec l'enzyme de conjugaison et le chromogène AEC pendant 5 minutes pour révéler la réaction, puis un rinçage final à l'eau distillée a été réalisé avant les observations.
Les observations ont été réalisées sur un microscope à transmission en lumière blanche. Un témoin négatif (même réaction sans la saturation des sites par la BSA) et un témoin positif (même réaction sur cellules non imprimées, cultivées sur plastique) ont été obtenus suivant le même protocole.

4.2. Microscopie Optique

Les observations ont été réalisées sur plusieurs microscopes optiques équipées de caméras CCD:

- Microscope droit Nikon Eclipse 80i
- Microscope inversé Zeiss Axiovert 25
- Microscope Droit Leica DM 5500B
- Microscope Droit Nikon Optiphot 2

Les grossissements utilisés étaient le 2x, 10x, 20x et 40x.
Les observations ont été faites en lumière blanche ou en microscopie à fluorescence.

Des observations en microscopie confocale ont été réalisées à la plateforme d'imagerie de Bordeaux 2 (Bordeaux Imaging Center: http://www.bic.u-bordeaux2.fr/) sur un microscope confocal Leica DMI6000 inversé TCS SP5 AOBS.

Pour les observations de cellules imprimées en microscopie confocale, les cellules ont été fixées 20 minutes dans du paraformaldéhyde à 1%, puis elles ont été rincées 2 fois en PBS 1x. Ensuite, une lamelle a été montée sur la lame receveuse et fixée avec du milieu de montage (Fluomount®) ou du vernis (type vernis à ongles translucide).

4.3. Observation au photon imageur des cellules transfectées par la luciférase

La prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* a été suivie en temps réel avec un photon imageur Biospace (Biospace®, Paris). Les acquisitions ont été réalisées au moins une fois par semaine pendant la durée des études.

Pour le suivi *in vitro*, la luciférine (Beetle Luciferin, Promega) était ajoutée au milieu de culture (3µg/ml) avant de placer les boites de culture dans le photon imageur. La quantification démarrait immédiatement après l'injection du substrat et les résultats

correspondaient aux valeurs mesurées quand le signal était maximum et stable pendant au moins 3 minutes.

Pour le suivi *in vivo*, les souris étaient anesthésiées par isofluorane (voir protocole §9), puis 100µl de luciférine (30µg/ml) étaient injectés en intrapéritonéal avant l'acquisition. La quantification était réalisée de la même façon que pour les expériences *in vitro*. Une enceinte d'anesthésie spécifique était utilisée pour ces observations: elle était munie d'une vitre sur le dessus pour laisser passer la lumière et de 5 emplacements pour les souris (berceaux).

Le signal était quantifié sur 30 secondes autour du plateau d'émission, puis les valeurs ont été exprimées en p/s/Sr (Photons / Secondes / Stéradian) grâce au logiciel Photo-Aquisition® et 3D Vision® (Biospace®) (Figure 24).

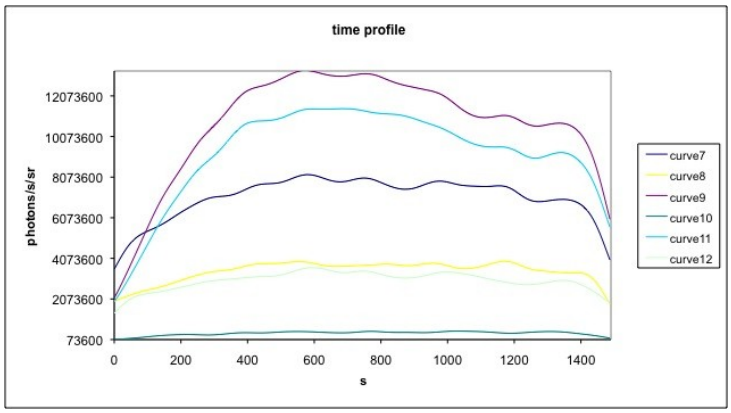


Figure 24: Observation de la luminescence émise par des cellules MG63 luc implantées dans des calvarias de souris. Dans cet exemple, le plateau d'émission est situé autour de 600 secondes.

5. *Méthodes Chirurgicales et évaluation de la reconstruction tissulaire in vivo*

5.1. Défaut osseux critique sur la calvaria de souris

Le défaut osseux critique de calvaria est un modèle de réparation osseuse validé chez la souris (151). Il permet de tester des biomatériaux et des produits d'ingénierie tissulaire osseuse sans contraintes mécaniques. Ce modèle présente également l'intérêt dans notre travail d'être accessible à la micro-impression d'éléments biologiques *in vivo* et *in situ*.

a) Animaux

Les animaux utilisés pour les expérimentations *in vivo* étaient des souris Nude, NOG, C57-Black ou OF-1, mâles ou femelles, âgées de 8 à 14 semaines au moment de la chirurgie. Les souris Nude et NOG sont des animaux immuno-déficients et ils ont été utilisés pour les expérimentations où des cellules humaines étaient implantées.

b) Anesthésies

Pour les défauts osseux de calvaria, les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale. La solution d'anesthésie a été préparée avec 1 ml de kétamine (Imalgène®) et 0,6 ml de xylazine (Rompun® 2%) pour un volume total de 5 ml (complété avec NaCl 0,5% w/v).

Pour les observations au photon imageur, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'une solution d'isofluorane (5%, 200µl/minute pour l'induction puis 1%, 200µl/minute pour l'entretien).

Après les chirurgies au niveau des calvarias, chaque souris a reçu une injection intra-péritonéale de Buprénorphine (Vetergesic®) à visée antalgique (3 µg / souris dans 100 µl de PBS 1X).

c) Défauts osseux latéraux ou défaut central

Après désinfection cutanée à l'alcool ou à la povidone iodée (bétadine®), une incision sagittale (lame 15) a été pratiquée à l'aplomb des yeux jusqu'à l'aplomb des oreilles. La peau et le périoste ont été écartés avec un décolleur avant de réaliser les défauts osseux.

Les défauts osseux ont été pratiqués au niveau de la calvaria avec un trépan de 4,7 mm de diamètre extérieur (TBR®, Toulouse, France) monté sur un micromoteur (300 tours/minute), sous irrigation avec du NaCl (0,5% w/v).
Les défauts latéraux étaient réalisés au niveau des deux os pariétaux, à distance du sinus sagittal supérieur et des sutures osseuses (Figure 25a) (151). Le défaut central était réalisé sur la suture entre les 2 os pariétaux, en arrière de la suture fronto-pariéatale et en avant de la suture pariétale – interpariétale. Ce défaut est donc situé à l'aplomb du sinus veineux sagittal supérieur (Figure 25b) (112). (Figure 25 Réalisée d'après (152)).

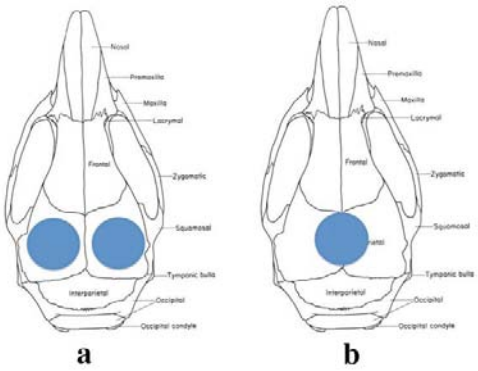


Figure 25: Localisation des défauts osseux de calvaria (a: Défauts latéraux; b: Défauts centraux)

La trépanation osseuse était réalisée à basse vitesse (400 tours / min), sous irrigation constante (NaCl 0,5%). La procédure était réalisée en plusieurs étapes pour ne pas léser la dure mère et le fragment osseux était détaché avec des pinces fines. Enfin, le site chirurgical était rincé avec de NaCl 0,5%.

d) Implantation et sutures

Les matériaux (hydroxyapatite, membranes de PCL) ont été placés au contact de la dure mère. Les plaies ont été suturées au vicryl® 4.0 ou 5.0 avec des points séparés.

e) Sacrifice

Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale ou par inhalation de CO_2 en fonction des expériences.

5.2. Implantations sous cutanée de cellules

L'objectif de cette étude était d'évaluer la prolifération sous cutanée de plusieurs types cellulaires chez la souris afin de sélectionner un modèle de cellule pour les implantations de matériaux cellularisés fabriqués par LAB.

a) Animaux et cellules

Dix souris NOG ont été utilisées pour évaluer la prolifération de cellules implantées en sous cutané.
Cinq souris ont été utilisées pour évaluer la prolifération des cellules MG63-Luc et 5 souris ont été utilisées pour évaluer la prolifération des cellules ADSC-Luc. Les culots cellulaires ont été suspendus dans 500µl de milieu sans sérum et injectés en sous cutané.
Dans le groupe MG63-Luc, chaque souris a reçu une injection bilatérale d'un culot cellulaire de 6 millions, 3 millions, 2 millions, 1 million ou 500000 cellules. Dans le groupe ADSC-Luc, chaque souris a reçu une injection bilatérale d'un culot cellulaire de 4 millions, 2 millions, 1 millions, 500000 ou 250000 cellules.

b) Suivi des cellules implantées en sous-cutané

L'évolution du volume des tumeurs a été suivi sur une période de 2 mois par une mesure hebdomadaire avec un pied à coulisse micrométrique (Figure 26).

La prolifération des cellules implantées a été évaluée par photon imageur (Biospace®), une fois par semaine pendant 2 mois (voir protocole ci-dessous).

A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale

puis les tumeurs ont été analysées en histologie non décalcifiée sur des coupes de 8 µm colorées à l'HES.



Figure 26: Mesure d'une tumeur sous cutanée chez la souris NOG avec un pied à coulisse micrométrique

5.3. Histologie

a) Prélèvement et fixation

Les prélèvements (têtes ou tumeurs sous cutanées) ont été fixés dans le formol (4%) à 4°C pendant 7 jours. Les échantillons étaient soit inclus en paraffine sans décalcification (tumeurs sous cutanées), soit inclus en résine sans décalcification (calvarias), soit inclus en paraffine après décalcification (calvarias). Les échantillons étaient orientés au moment de l'inclusion.

b) Histologie en paraffine (échantillons non calcifiés ou décalcifiés)

L'histologie décalcifiée permet de réaliser des observations de la composante cellulaire des tissus, cependant, la morphologie générale des tissus calcifiés ne peut être évaluée avec cette méthode.
Après fixation, les échantillons non calcifiés ont été déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70, 80, 90 et 100%) inclus en paraffine et coupés à 5µm.
Les échantillons calcifiés (calvarias) ont été décalcifiés pendant 12h dans une solution de décalcifiant osseux (Décalcifiant osseux Bayer® ref 70033, France) puis ils ont été découpés (au bistouri) et orientés avant leur inclusion en paraffine. Les échantillons décalcifiés ont été colorés à l'Hématéine Eosine Safran (HES).

c) Histologie en résine (échantillons non décalcifiés)

L'histologie non décalcifiée permet d'observer la morphologie générale du tissu, et en particulier de quantifier les volumes osseux reconstruits.
Les échantillons ont été déshydratés dans l'éthanol (70, 80, 90 et 100%) puis dans l'isopropanol. Ils ont ensuite été inclus dans une solution de méthyl-métacrylate et butyl-métacrylate (153). Des coupes de 80 µm ont été obtenues avec une scie (Leica SP 1600, Germany) et colorées au vert lumière.

d) Observation et Acquisition des images

Les coupes ont été observées sur un microscope photonique avec des grossissements de x2, x10 ou x20. Les images ont été enregistrées grâce au logiciel Nikon NIS Elements 3.1.

5.4. Micro-scanner

Le micro-scanner permet d'observer la morphologie et de quantifier les volumes osseux sur un

échantillon. Il permet également de recueillir les paramètres de la micro-architecture osseuse.

a) Acquisition

Les images ont été obtenues sur un micro scanner General Electric® avec une résolution de 14µm. La tension et l'intensité étaient de 80kV et de 60mA. Huit cent vues ont été obtenues avec un temps d'exposition par vue de 3000 ms. Les zones d'intérêt ont été reconstruites à partir du volume total avant les quantifications grâce au logiciel GEHC MicroView®.

b) Reconstructions et quantification de la surface minéralisée

La quantification de la néoformation osseuse a été faite à partir d'un volume 3D représentant la région d'intérêt. Ce volume a été déterminé comme un cylindre de 3 mm de diamètre et de 60 coupes d'épaisseur (60 x 14 µm = 840 µm). Il était placé au centre de chaque défaut osseux pour la quantification (Figure 27) et correspondait à la forme de chaque défect osseux.

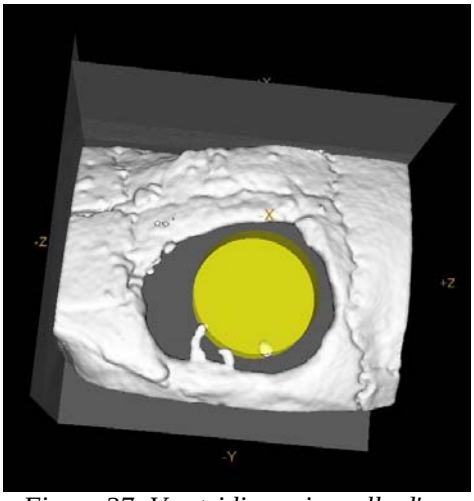


Figure 27: Vue tridimensionnelle d'un défaut osseux observé par micro-scanner avec superposition de la zone d'intérêt (tracée en jaune).

c) Analyses statistiques

Les résultats quantitatifs obtenus en mirco-scanner ou en bio-luminescence ont fait l'objet d'une analyse statistique lorsque les échantillons étaient suffisants. Les échantillons indépendants ont été analysés avec le test de Mann-Whitney et les échantillons appariés ont été analysés avec le test de Wilcoxon. Le seuil de significativité était placé à 2,5 ou 5%. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel MedCalc® ou bien avec le logiciel Excel®.

RÉSULTATS

L'objectif de cette seconde partie est de présenter les résultats obtenus chronologiquement depuis la préparation des encres jusqu'à la réalisation de structures tridimensionnelles *in vitro* et à l'implantation *in vivo* des matériaux fabriqués.

La première étape a donc consisté à préparer des encres biologiques ayant un intérêt en ingénierie tissulaire osseuse et nous nous sommes intéressés à l'hydroxyapatite nano-cristalline (nHA) et à des cellules ostéoblastiques primaires (HOP) et de lignée (MG63). Une encre de nHA a été préparée par précipitation humide puis nous avons caractérisé ses propriétés morphologiques, structurales et physico-chimiques avant et après impression. Les propriétés biologiques de cette encre de nHA ont également été évaluées sur des cellules ostéoblastiques de lignée MG63. Ces expérimentations ont confirmé la nature chimique du matériau et ont montré que l'impression par LAB ne modifiait pas ses propriétés chimiques ni biologiques. Ensuite, des encres de cellules ont été élaborées à partir de plusieurs modèles cellulaires différents, puis nous avons évalué l'influence du LAB sur la viabilité et le phénotype des cellules imprimées. Plusieurs paramètres d'impression ont été testés plus spécifiquement comme l'énergie du laser, la viscosité de l'encre ou la nature du substrat receveur. Nous avons pu déterminer des conditions d'impressions qui n'affectent pas la viabilité ni le phénotype cellulaires.

Après avoir préparé ces encres, des assemblages à plusieurs composants ont été réalisés par des impressions séquentielles, en superposant des couches d'encres différentes. Plusieurs assemblages de cellules et de nHA ont été réalisés *in vitro* afin de montrer l'intérêt du LAB pour la micro-organisation tissulaire. Ensuite, nous avons montré qu'il était possible de réaliser des impressions de cellules et d'hydroxyapatite *in vivo* et *in situ* chez la souris, avec un maintien dans le temps des propriétés des encres imprimées. Nous avons finalement démontré qu'un matériau structuré tridimensionnel préparé « couche par couche » était plus favorable à la prolifération cellulaire *in vivo* qu'un matériau non structuré utilisant les mêmes éléments.

A: Impressions par LAB en 2 Dimensions

Les impressions en 2D ont été réalisées à partir d'encres ayant un intérêt en ingénierie tissulaire osseuse. Les encres ont été préparées spécifiquement pour cette application, puis elles ont été caractérisées avant et après impression.

Tout d'abord une encre d'hydroxyapatite nano-critalline a été synthétisée et caractérisée au niveau chimique et biologique. Nous avons ensuite déterminé les paramètres d'impression de cette encre et nous avons obtenu une résolution minimale de 60µm. De plus, nous avons montré que les propriétés physico-chimiques et biologiques du matériau n'étaient pas affectées par le processus d'impression par LAB.

Ensuite, des encres de cellules ont été préparées à partir de plusieurs types cellulaires et la survie des cellules après impression a été évaluée. Nous avons imprimé des cellules primaires ADSC et HOP et des cellules de lignée MG63 et E&hy926. Certains paramètres d'impression ayant une influence sur la survie cellulaire ont été plus spécifiquement étudiés. Il s'agissait de l'énergie laser utilisée, de la viscosité de l'encre et de la nature et l'épaisseur du substrat receveur.

Ces étapes préliminaires de préparation des encres et les premières impression en 2D sont des étapes nécessaires pour ensuite de réaliser des structures plus complexes associant plusieurs encres en 2D ou en 3D.

1. Impressions d'hydroxyapatite en 2D

1.1. Synthèse et caractérisation de l'hydroxyapatite nanocristalline

L'objectif de cette étape préliminaire était de synthétiser une hydroxyapatite nano-cristalline et de la caractériser au niveau physico-chimique et biologique. La finalité de cette synthèse était de préparer une encre pour réaliser des impressions par LAB.

La méthode utilisée pour la synthèse d'hydroxyapatite nano-cristalline (nHA) était la précipitation humide (149) puis le matériau a été déshydraté pour les caractérisations physicochimiques. Le rendement de la réaction était de 96 % (ratio entre masse mesuré et masse théorique).

L'examen morphologique par MET a permis d'observer des cristaux en forme de bâtonnets de 50 à 100nm de long. De plus la micro-analyse X par MET a révélé un rapport Ca/P de 1.67 (Figure 28).

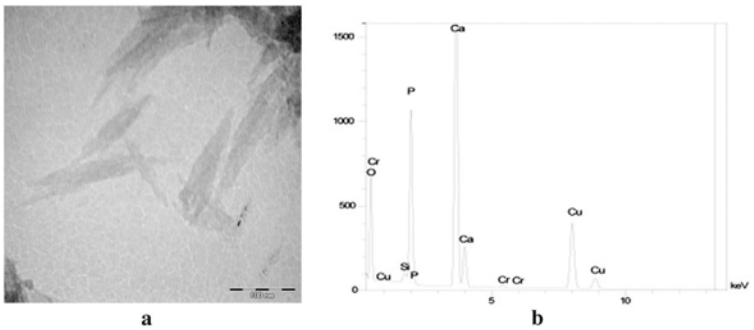


Figure 28: Observation par MET de la poudre de nHA (a: Examen morphologique des cristaux; b: Microanalyse X montrant un rapport P/Ca de 1.67)

L'examen de la poudre en DRX a montré un spectre compatible avec une hydroxyapatite carbonatée[Ca_{10} $(PO4)_3$ (CO3)0,01 (OH)1,3], avec des paramètres de maille hexagonale (*a*=9.44 Å; *c* = 6.88 Å) (Figure 29). La fiche JCPDS la plus proche du matériau analysé était la N° 9-432.

Des vibrations spécifiques aux fonctions phosphate et hydroxyle ont été observées en spectroscopie infra rouge. Les fonctions phosphates étaient présentes à 960 cm^{-1} (ν1 PO_4^{3-}), 1033 cm^{-1} (ν3 PO_4^{3-}), 570 cm^{-1} et 601 cm^{-1} (ν4 PO_4^{3-}) et les fonctions hydroxyles ont été observées à 3568 cm^{-1}, dans la région de l'eau. De plus des fonctions carbonate ont été mises en évidence à 1420 cm^{-1} (ν3 CO_3^{2-}) et (ν2 CO_3^{2-}). Nous étions donc en présence d'une hydroxyapatite carbonatée (Figure 29).

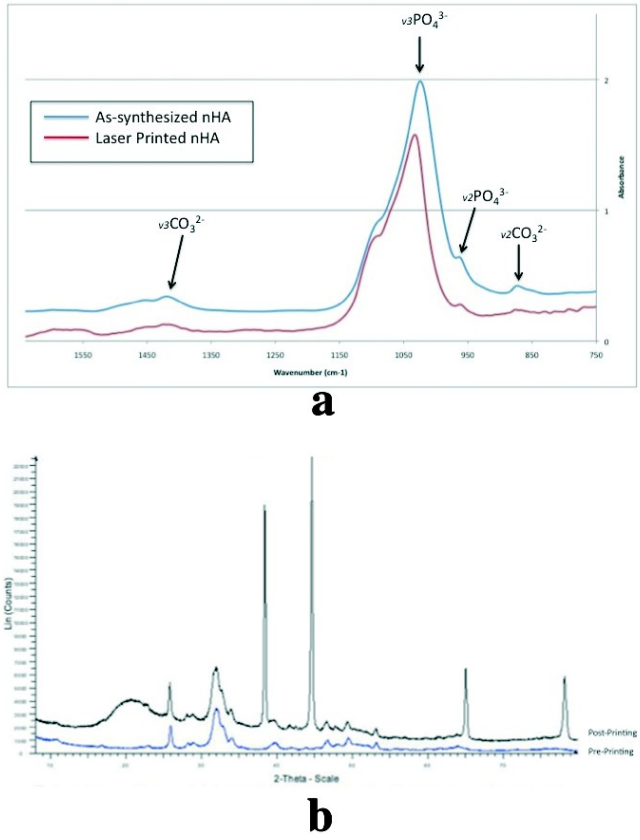


Figure 29: Caractérisation de la nHA avant et après impression par LAB (a: FTIR; b: DRX)

La caractérisation biologique *in vitro* a été faite avec des cellules MG63 cultivées sur la poudre stérilisée. Les résultats du test de viabilité (Live/Dead) et des observations de la morphologie des cellules en contact avec le matériau (MEB) ont révélé une forte affinité des cellules MG63 pour la nHA après 12 jours de culture. La phosphatase alcaline était exprimée dès le 3e jour sur les cellules cultivées en présence de la poudre de nHA. Le test au MTT a montré que les cellules conservaient leurs capacités de prolifération pendant les 6 jours de culture (Figure 30).

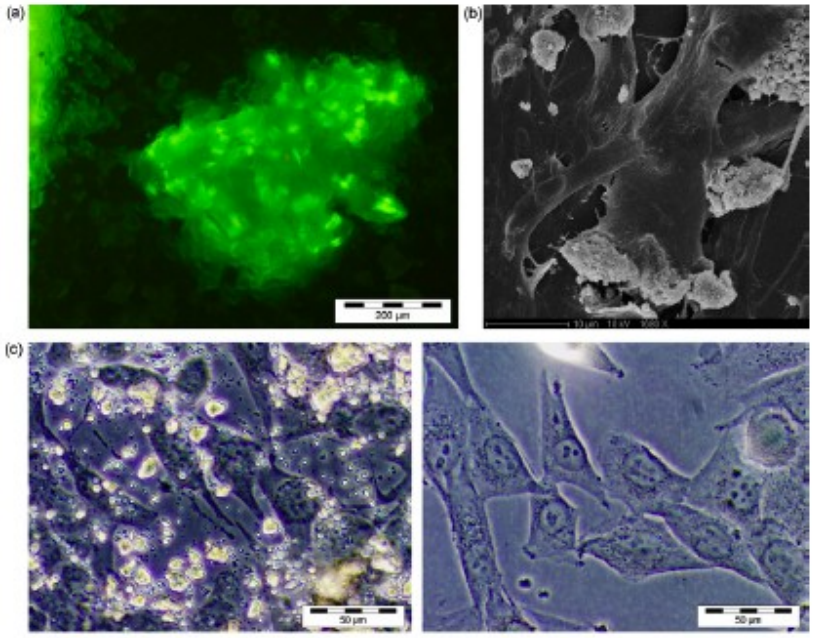


Figure 30: Caractérisation biologique de la nHA avant impression (a: test au live dead sur des cellules MG63 cultivées 12 jours en présence du matériau; b: Observation en MEB des cellules MG63 cultivées 12 jours en présence du matériau; c droite: Test à la Phosphatase Alcaline après 3 jours de culture des MG63 en présence du matériau; c gauche: Contrôle de la Phosphatase Alcaline exprimée par les MG63 après 3 jours de culture)

La caractérisation biologique *in vivo* après implantation dans des défauts osseux critiques sur la calvaria de souris C57 Black (n=8) a montré sur coupes histologiques une reconstruction osseuse partielle après 1 mois (Figure 31) et complète après 3 mois (Figure 32) de cicatrisation (154).

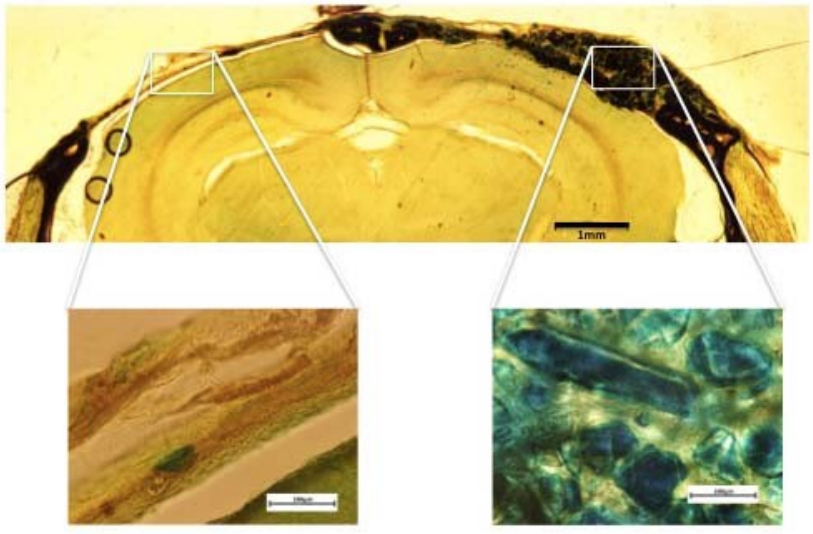


Figure 31: Histologie non décalcifiée de défauts osseux critiques de calvaria comblés par nHA (droite) ou laissés vides (gauche) après 1 mois de cicatrisation

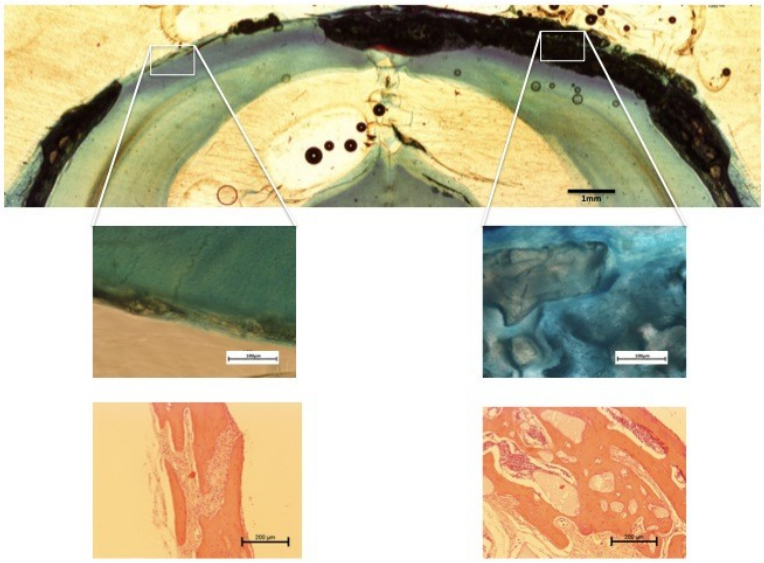


Figure 32: Histologie non décalcifiée (haut) ou décalcifiée (bas) de défauts osseux critiques de calvaria comblés par nHA (droite) ou laissés vides (gauche) après 3 mois de cicatrisation

1.2. Détermination des conditions d'impression de l'encre de nHA

L'objectif principal de cette partie était d'imprimer la nHA préparée précédemment. Les objectifs secondaires étaient de caractériser les propriétés physico-chimiques et biologiques du matériau après impression et de les comparer avec ses caractéristiques initiales. Enfin, nous voulions définir les conditions d'impressions par LAB qui permettaient d'obtenir une résolution spatiale optimale.

L'encre a été préparée à partir de la solution synthétisée par précipitation humide après ajustage du pH et retrait d'une partie du surnageant (155). La détermination des paramètres de micro-impression laser a permis d'imprimer des gouttes de nHA homogènes. L'analyse de la répartition du diamètre des gouttes a montré que ce diamètre augmentait avec l'énergie laser utilisée (155). La meilleure résolution était de 60µm environ avec ce matériau (Figure 33). Nous avons également montré que l'utilisation d'énergie trop importante provoquait la formation de gouttes mal résolues entourées de gouttes satellites (splashing) (121).

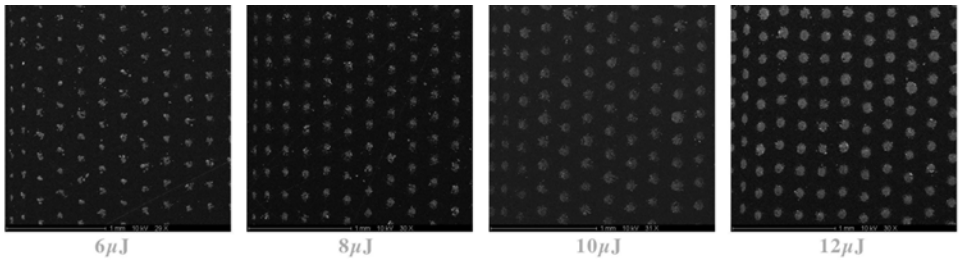


Figure 33: Variation du diamètre des gouttes en fonction de l'énergie utilisée

Plusieurs motifs ont été imprimés en faisant varier les paramètres d'impression: il s'agissait de matrices de points, de cercles, de rectangles scannés ou d'images enregistrées sous format .bmp et importées dans l'ordinateur (Figure 34).

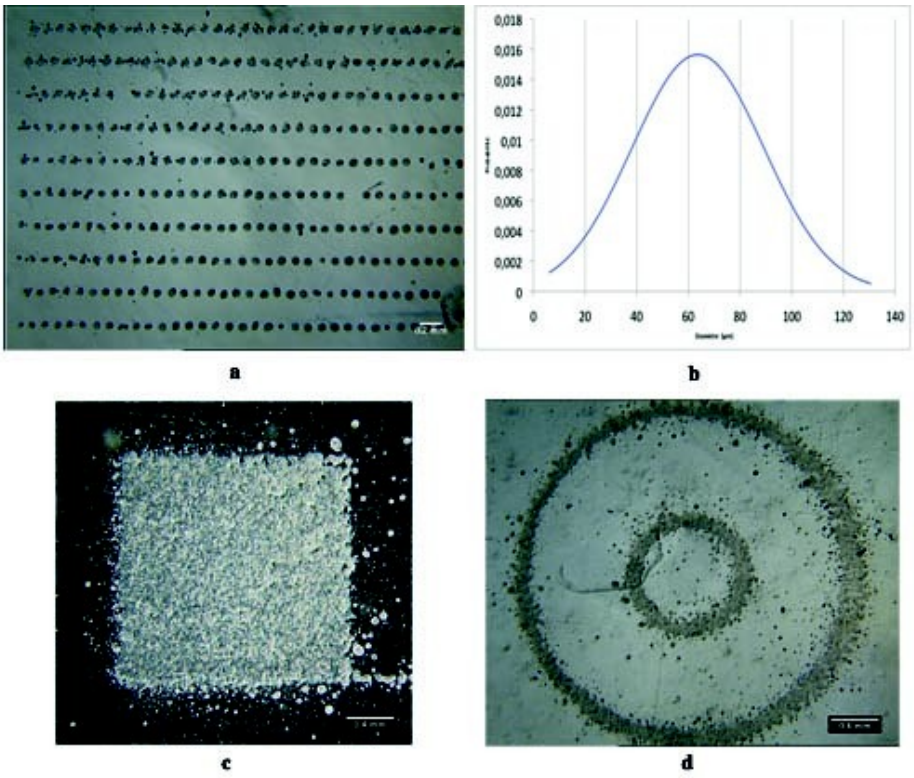


Figure 34: Variation des motifs avec l'encre de nHA imprimée par LAB

(a): Matrice de gouttes. Les paramètres laser étaient: Fréquence (F) 5 kHz; Puissance (P) 27 mW; vitesse des scanner (V) 600 mm/s;

(b): Répartition de diamètre des gouttes de la figure a (63,5 µm en moyenne),

(c): Carré scanné de 3mm2(F1 P10 V100),

(d): Cercles Concentriques (F5 P80 V200)

La caractérisation physico-chimique de la nHA après impression a montré que la structure du matériau était globalement conservée, mais qu'un fonction carbonate supplémentaire était apparue vers 1520 cm^{-1} (Figure 29, Page 67). Cette substitution a pu apparaître sur les fonctions hydroxyle ou phosphate du cristal d'hydroxyapatite après interaction avec le CO_2 ambiant.

Les propriétés biologiques de la nHA imprimée ont été évaluées avec des cellules MG63. Plusieurs motifs de nHA ont été imprimés sur un matelas d'agarose, puis les cellules ont été déposées à la pipette sur cette lame receveuse. Nous avons montré que les motifs de nHA imprimés sous forme de cercles ou de gouttes isolées permettaient de guider la prolifération cellulaire. En effet, nous avons observé des agrégats cellulaires sur les gouttes de nHA et un alignement des cellules sur les cercles de nHA (Figure 35, Page 71) (155) Ces observations ont permis de confirmer que les propriétés biologiques de la nHA ne sont pas altérées par l'impression par LAB.

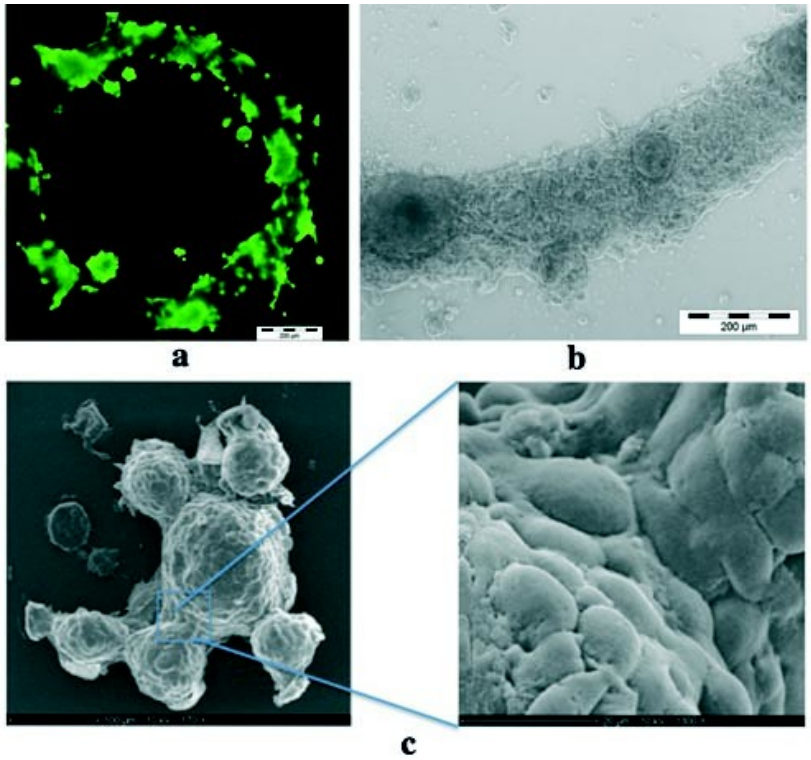


Figure 35: Culture de cellules MG63 sur des motifs de nHA imprimés par LAB (a: Test au Live/Dead après 6 jours de culture sur un cercle de nHA; b: Détail du cercle observé en lumière blanche; c: Observation en MEB après 6 jours de culture montrant les agrégats de nHA sur le matériau imprimé)

2. DÉTERMINATION DES CONDITIONS D'IMPRESSIONS DES CELLULES

2.1. Viabilité et Phénotype des HOPs imprimées sur Matrigel® ou nHA

L'objectif de cette partie était de préparer et d'imprimer une encre de cellules HOP (Human Osteo Progenitors), puis d'évaluer la viabilité, le maintien des capacités de prolifération et du phénotype de ces cellules après impression.

L'encre de cellules HOP a été préparée dans du milieu de culture (IMDM) avec une concentration de 50.10^6 cellules/ml, et supplémentée avec 0,5% d'alginate (w/v). Le substrat receveur a été recouvert d'une couche de Matrigel® 100µm. Dans d'autres cas, la couche absorbante pouvait était une couche de nHA imprimée préalablement (Figure 46, Page79) (155).

Dans le cas des impressions sur Matrigel®, les noyaux cellulaires ont été colorés (Hoechst) pour pouvoir compter les cellules, puis nous avons imprimé des matrices de gouttes. Nous avons observé des gouttes de 180 µm environ qui contenaient chacune environ 50 cellules (Figure 36 a-b). Après 2 jours de culture, les cellules étaient étalées sur le substrat et le motif initial était toujours visible (Figure 36 c). Après 15 jours de culture, les cellules avaient proliféré et recouvraient toute la surface de la lame (Figure 36 d).

Le phénotype ostéoblastique a été observé sur les cellules imprimées grâce à un marqueur précoce (Phosphatase Alcaline, Figure 2.7 e) et à un autre marqueur plus tardif (Ostéocalcine, Figure 2.7 f) après 7 jours et 15 jours de culture.

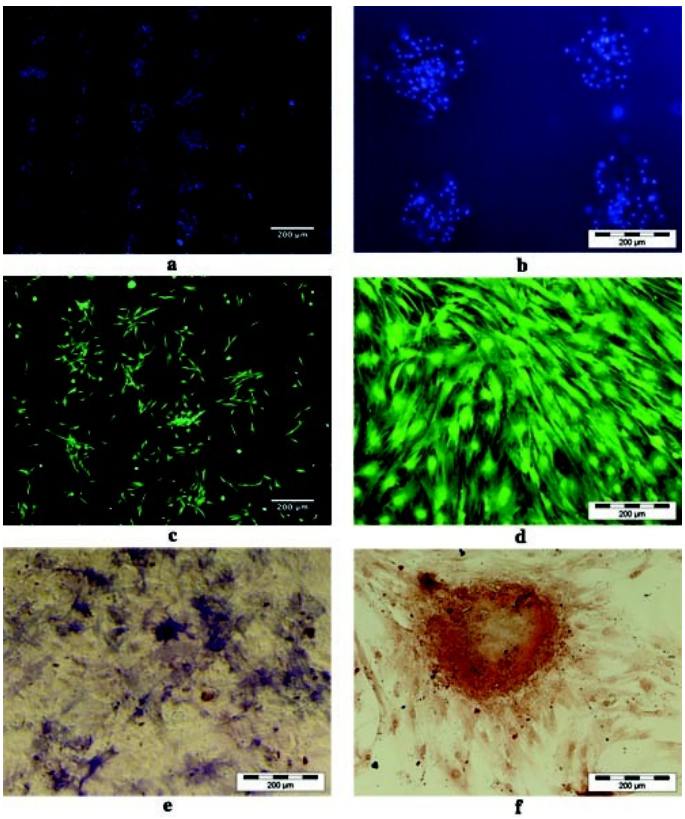


Figure 36: Impression de cellules HOP imprimée sur Matrigel (a: Matrice de cellules colorées par le hoechst le jour de l'impression; b: Zoom de l'image a; c: Test au Live/Dead, 2e jour; d: Test au Live/Dead, 15e jour; e: Test à la phosphatase alcaline, 15e jour; f: Immuno-marquage de l'ostéocalcine, 15e jour)

2.2. Influence de 3 paramètres d'impression sur la viabilité des cellules Ea-hy926 imprimées

L'objectif de cette série d'expériences était d'évaluer l'influence de 3 paramètres d'impression (énergie, viscosité de l'encre et épaisseur du Matrigel® sur la lame receveuse) sur la viabilité de cellules endothéliales de lignée Ea-hy926.

Des études antérieures ont montré l'effet négatif d'une énergie laser importante sur la viabilité cellulaire. D'autres études avaient montré l'intérêt d'ajouter une couche d'hydrogel sur la lame receveuse afin d'amortir les contraintes subies par les cellules lors de leur « atterrissage » sur la lame receveuse. Dans notre travail, nous avons établi une relation entre ces deux paramètres et nous avons également étudié l'influence de la viscosité de l'encre pour favoriser la viabilité des cellules après impression. L'encre de cellules a été préparée dans du milieu de culture (DMEM) avec une concentration de 50.10^6 cellules/ml, et supplémente avec 0,5 ou 1% d'alginate. La couche de Matrigel® sur le substrat receveur variat de 20 à 100µm.

Tout d'abord, l'effet négatif d'une augmentation de l'énergie laser sur la viabilité cellulaire a été confirmée dans nos conditions expérimentales avec une couche de 100 µm de Matrigel® sur le substrat receveur (Figure 37). Nous pouvons cependant observer que dans toutes les conditions présentée sur cette figure la viabilité est partiellement maintenue car une couche importante de Matrigel® est présente.

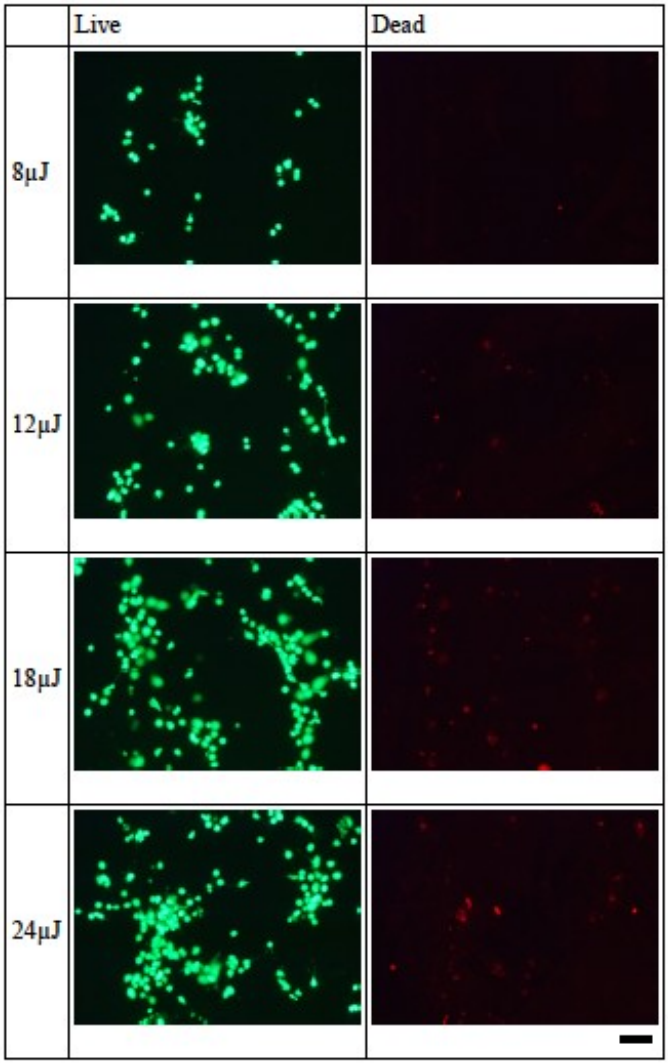


Figure 37: Effet de l'énergie sur la viabilité cellulaire

Ensuite, nous avons évalué les effets combinés de l'énergie laser et de l'épaisseur de Matrigel® sur le receveur (Figure 38). Les résultats ont montré qu'il est possible de maintenir la viabilité cellulaire en diminuant l'énergie du laser ou en augmentant l'épaisseur du matelas d'hydrogel. En effet, lorsqu'une faible épaisseur de Matrigel® est utilisée (20 µm et 40 µm), les cellules sont mortes avec une énergie élevée (24 µJ) alors qu'elles survivent avec une faible énergie (8 µJ). Lorsque de fortes énergies doivent être utilisées (pour imprimer davantage de cellules par exemple), il faudra recouvrir le substrat receveur d'une couche d'hydrogel plus importante.

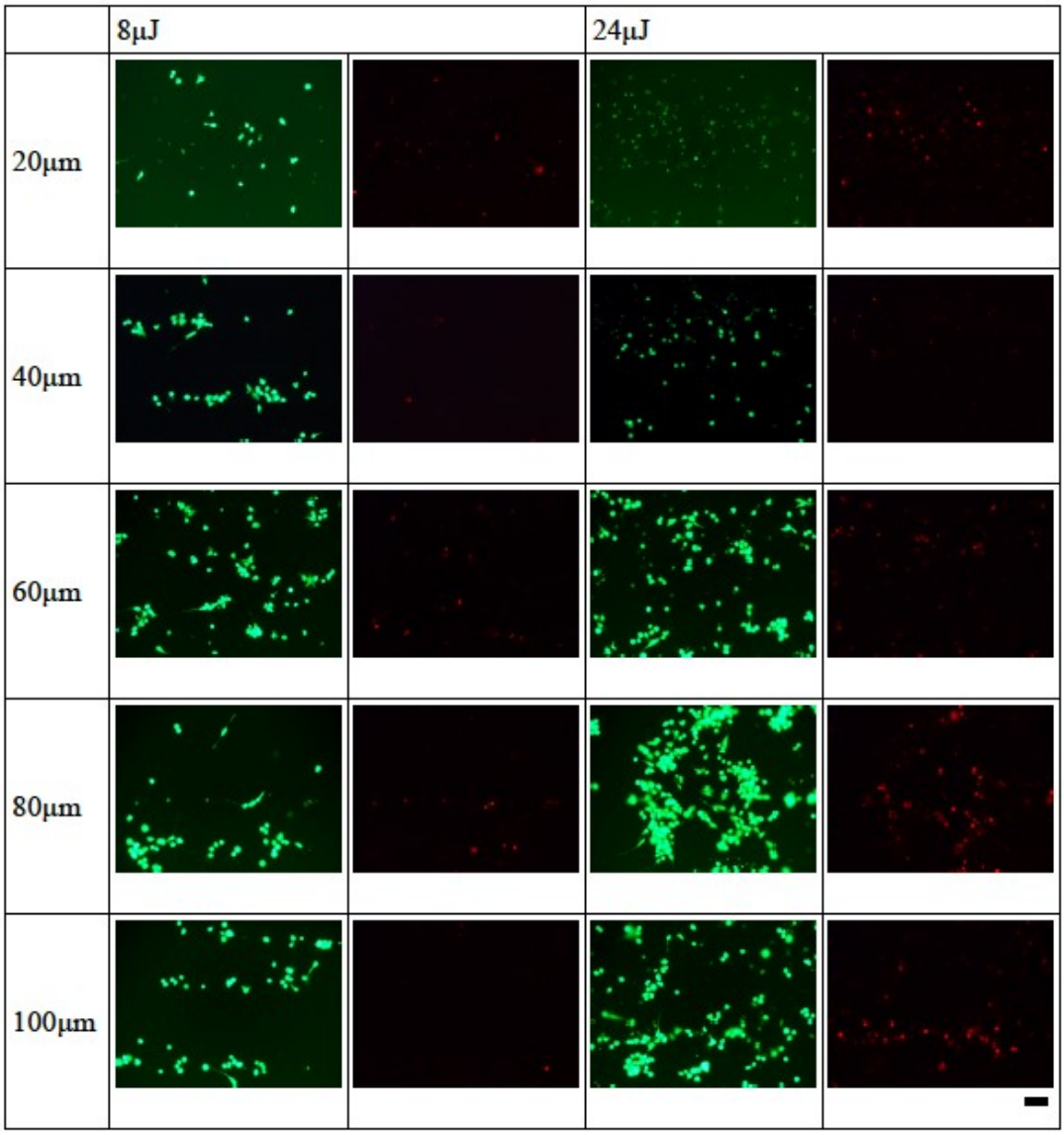


Figure 38: Effet de l'énergie et de l'épaisseur de Matrigel® sur la viabilité cellulaire

Enfin, nous avons montré que dans le cas où une faible épaisseur de Matrigel® était utilisée, il était possible de favoriser la survie cellulaire en augmentant la viscosité de la solution. Ainsi, en augmentant la quantité d'alginate dans l'encre de cellules de 0,5 à 1% (w/v), la viabilité cellulaire était clairement supérieure. On pouvait voir que les cellules étaient très vertes et étalées dans les cas favorables alors qu'elles étaient faiblement vertes et rondes dans les conditions avec 0,5% (w/v) d'alginate (Figure 39). Les résultats ont été comparés à un témoin positif (Encre de cellules non imprimées, ensemencée dans un puits de culture) et à un témoin négatif (cellules fixées à l'éthanol dans un puits de culture) (Figure 40).

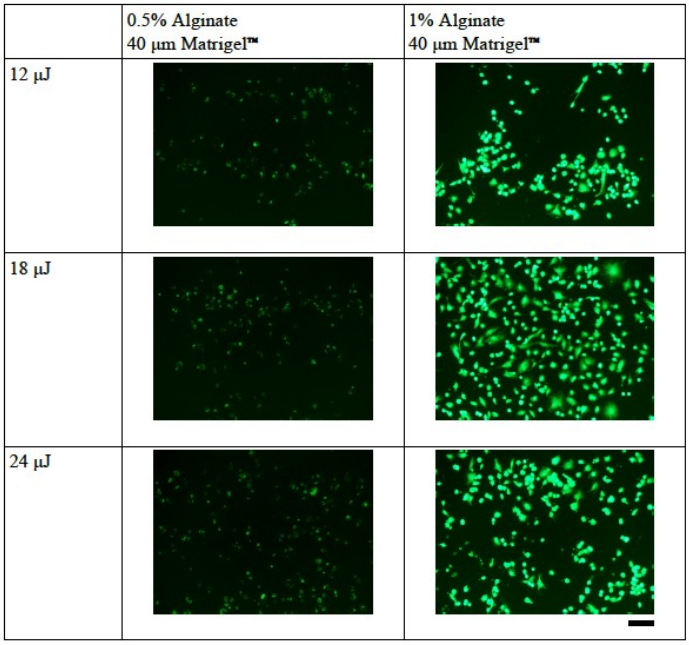


Figure 39: Effet de la viscosité de l'encre sur la viabilité cellulaire après impression

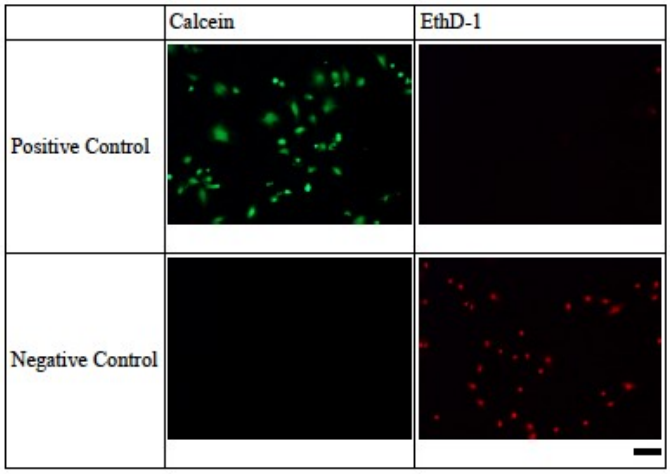


Figure 40: Témoins positifs et négatifs

2.3. Viabilité des autres types cellulaires utilisés

L'objectif de ces expérimentations était d'évaluer l'influence de l'impression par LAB sur la viabilité d'autres types cellulaires utilisés dans ce travail.

Les cellules souches mésenchymateuses issues de tissu adipeux (ADSC) ont été imprimées avec une concentration de 50.10^6 cellules/ml avec 1% d'alginate sur une couche de Matrigel® (100µm). Aprés 12 à 24 heures, les cellules étaient étalées et positives au test du Live/Dead. Après 7 jours, le motif initial n'était plus retrouvé (Figure 41). On remarque sur une vue à fort grossissement que les cellules sont imprimées dans une goutte et qu'elles ont tendance à s'étaler et à migrer depuis cette goutte après 12 à 48h de culture. Après 48h de culture, les cellules imprimées avaient une morphologie comparable aux cellules cultivées sur plastique ou sur Matrigel® (Figure 42).

On a observé en microsopie optique qu'une partie des cellules ADSC – GFP imprimées sur un matelas de Matrigel® sont étalées alors que l'autre partie des cellules restent rondes. De plus, on voit que les cellules rondes sont réparties sur un plan plus proche de l'interface air-Matrigel® (plan superficiel) et que les cellules étalées sont plus proches de l'interface Matrigel®-verre (plan profond) (Figure 43). La microscopie confocale vient confirmer ces observations: en effet, les cellules se répartissent sur l'ensemble de l'épaisseur du Matrigel®. Une partie des cellules traversent tout le matelas et peuvent alors s'étaler sur la lame de verre sous jacente et l'autre partie des cellules restent dans la partie supérieure de l'hydrogel (Figure 44).

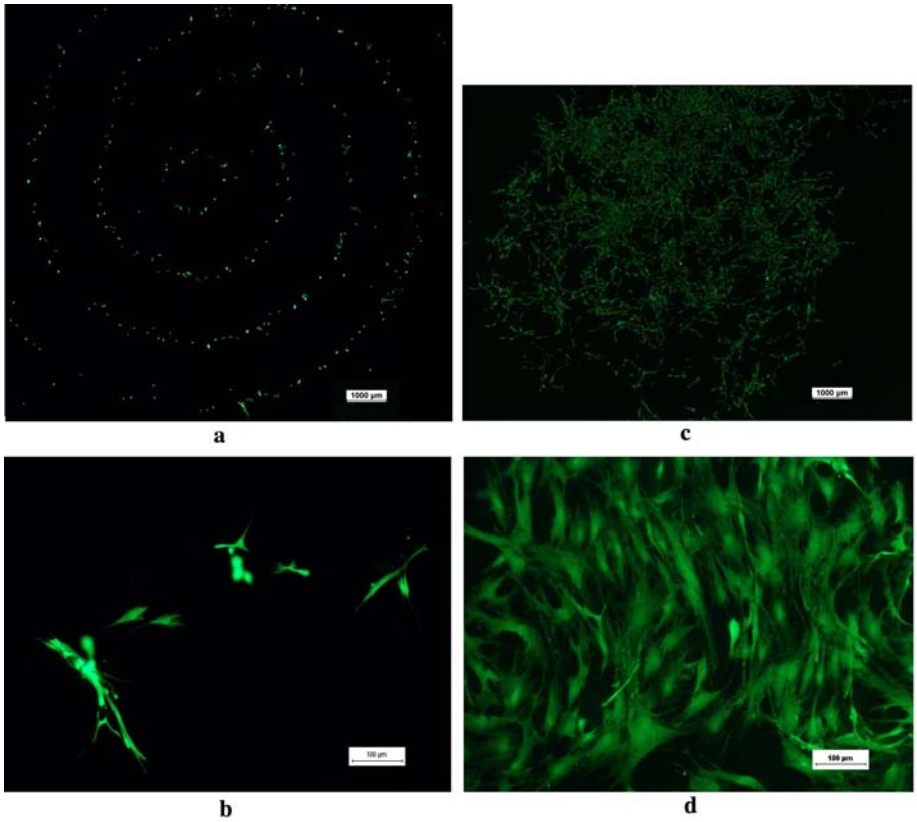


Figure 41: Cellules ADSC imprimées sur Matrigel®. Motif initial en cercles concentriques à J1 (a) et détail à J1 (b). Perte du motif imprimé à J7 (c) et détail à J7 (d)

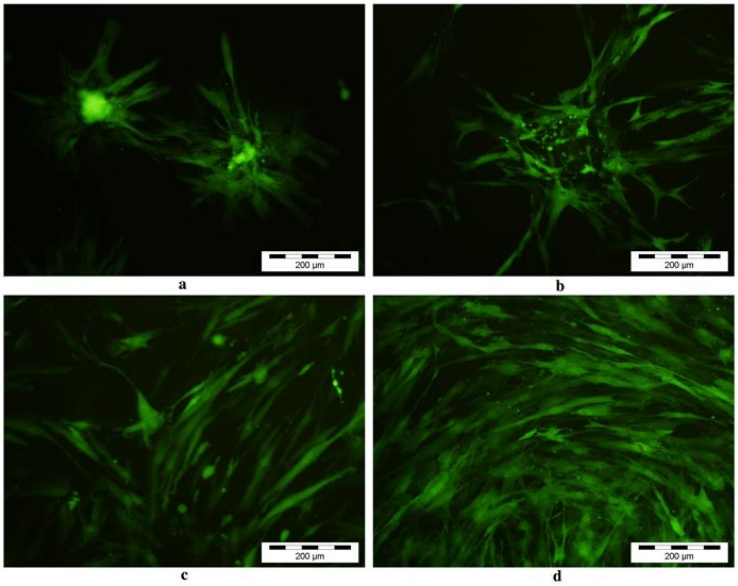


Figure 42: Cellules ADSC - GFP imprimées sur Matrigel à 12h (a) et 48h (b). Témoin positif sur Matrigel® (c) et sur plastique (d) à 48h

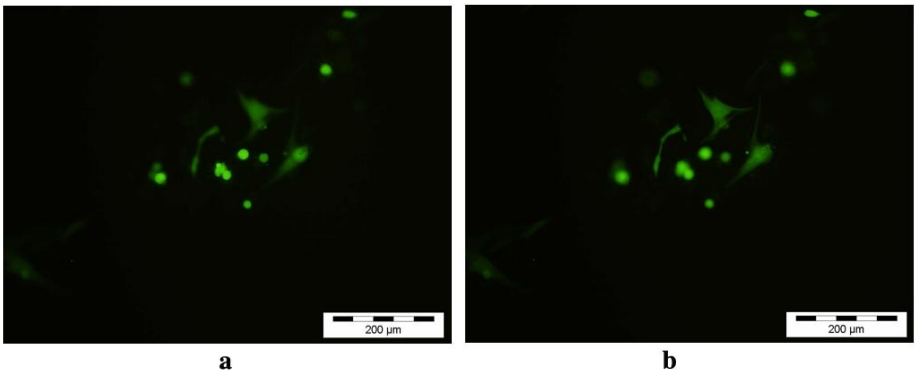


Figure 43: Observation en Microscopie optique de cellules ADSC-GFP réparties sur 2 plans: les cellules les plus superficielles sont rondes (a) et les cellules profondes sont étalées (b)

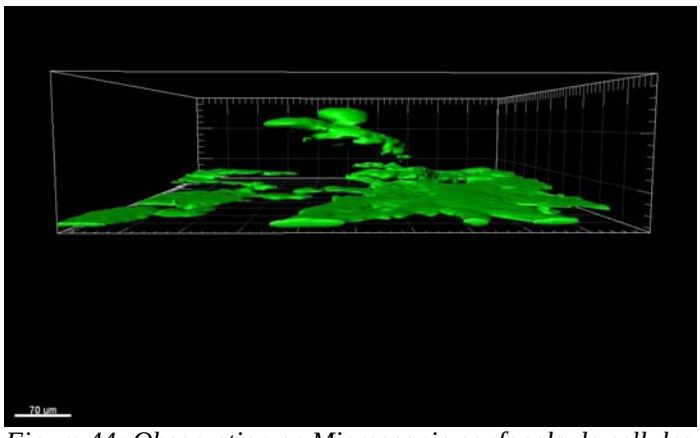


Figure 44: Observation en Microscopie confocale de cellules ADSC - GFP imprimées 24 heures après impression sur Matrigel®. Les cellules sont réparties dans toute l'épaisseur du Matrigel (100µm)

Les cellules MG63 ont également été imprimées avec une concentration de 50.10^6 cellules/ml supplémentées avec 1% d'alginate sur une couche de Matrigel® (100µm). Après 24 heures, le test au Live/Dead était positif et es cellules étaient étalées (Figure 45).

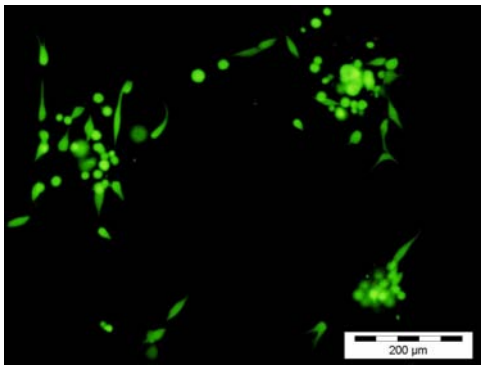


Figure 45: Cellules MG63 imprimées sur Matrigel (Test au Live/Dead 24 heures après impression)

3. IMPRESSIONS «MULTICOULEURS»

La station de travail LASIT comprend un carrousel pouvant supporter jusqu'à 5 lames donneuses différentes, permettant ainsi d'imprimer plusieurs encres successivement avec une résolution importante, tout en contrôlant la position spatiale des différents éléments imprimés.

3.1. nHA + HOPs

Le premier objectif de cette expérimentation était d'évaluer la faisabilité d'une impression séquentielle de 2 encres différentes par LAB. Ensuite, l'effet sur la viabilité et la prolifération cellulaires de l'impression conjointe de ces 2 matériaux a pu être observée.

Après avoir déterminé les conditions d'impression de nHA et des HOPs, ces deux encres ont été imprimées successivement en couches superposées. L'hydroxyapatite a été imprimée en premier sous la forme d'un carré scanné (6 couches), puis une couche de cellules a été imprimées au-dessus sous la forme d'un cercle (Figure 46a-b). Après l'impression, on pouvait distinguer les 2 matériaux superposés, mais après 3 jours de culture, il était difficile de distinguer les contours du cercle de cellules imprimé du fait de la prolifération cellulaire sur le carré de nHA. Après 6 jours, on a constaté que les cellules avaient proliféré et avaient migré sur toute la surface du carré de nHA (Figure 46c-d) (155). Dans ce cas, la couche de nHA a joué de rôle de matelas absorbeur de choc et a permis la survie et la prolifération des cellules HOP. Les observations en MEB montrent après 3 et 6 jours de culture que les cellules sont étalées sur le matériau imprimé (Figure 46 e-f). Enfin, il était possible de mettre en évidence la PAL sur les HOP imprimées après 6 jours de culture (Figure 47, Page 80).

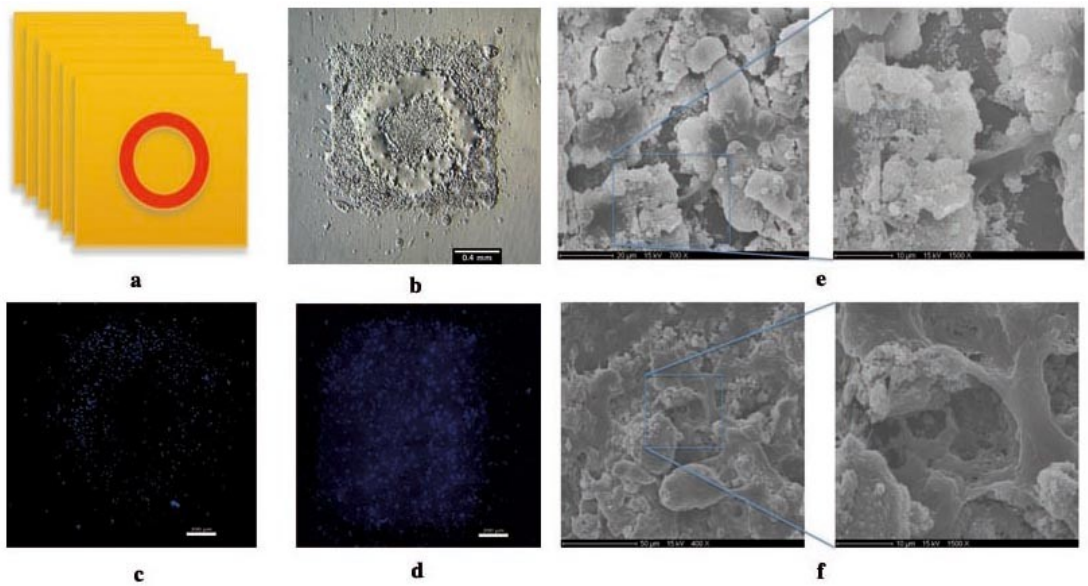


Figure 46: Impression séquentielle de nHA et de cellules HOP (a: Représentation schématique de l'expérimentation; b: Image en microscopie optique immédiatement après impression; c: Marquage des cellules en hoechst après 3 jours de culture; d: Marquage des cellules en hoechst après 6 jours de culture; e: Observations en MEB après 3 jours de culture; e: Observations en MEB après 6 jours de culture)

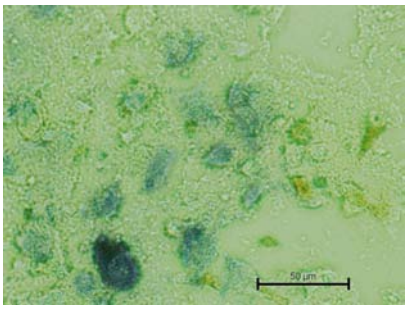


Figure 47: Marquage à la Phosphatase alcaline des cellules HOP imprimées sur un matelas de nHA après 6 jours de culture.

3.2. nHA + MG63

Le but de cette impression séquentielle de nHA et de cellules MG63 était d'évaluer les capacités du LAB pour imprimer des motifs prédéfinis par informatique dont les coordonnées spatiales étaient importées au format .bmp.

Dans cet exemple, nous avons importé deux images au format .bmp pour fêter Noël 2009 avec de la nHA et des MG63 (Figure 48).

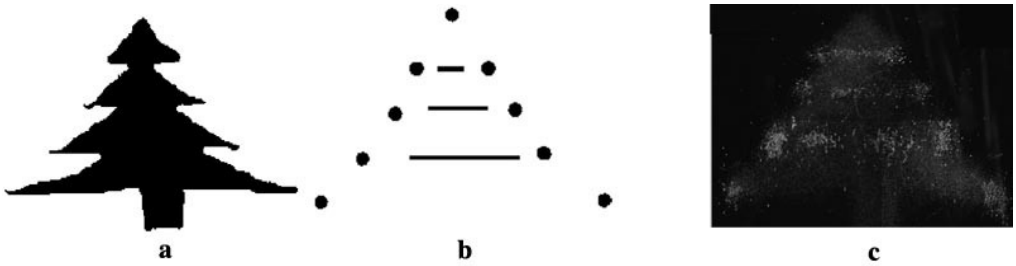


Figure 48: Impression de motifs de nHa et MG63 à partir de .bmp (a: Motif du tracé d'hydroxyapatite; b: Motif de l'impression de cellules; c: Résultat de l'impression)

3.3. ADSC-GFP et ADSC-Tomato

Dans cette expérimentation, nous voulions d'une part montrer une impression séquentielle avec des de cellules ADSC marquées par deux fluorochromes différents, mais également de montrer l'intérêt de ce marquage dans le suivi des cellules imprimées (Figure 49).

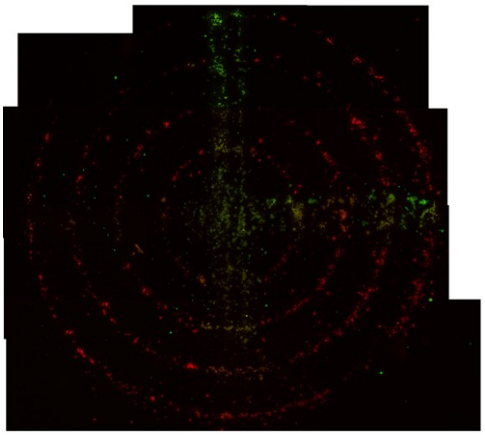


Figure 49: Impression d'ADSC-Tomato sous forme de cercles concentriques et d'ADSC sous forme d'une croix

3.4. Cercles concentriques de cellules Ea-hy926

L'objectif de cette impression de cercles concentriques de cellules Eahy926 était d'illustrer la résolution de la méthode LAB.

Deux encres de cellules Ea-hy926 (Concentration: 60 Millions de cellules / ml + 1% Alginate w/v) ont été colorées soit par le Dil-LDL (2µg/ml) soir par la calcéine (4µM) pour imprimer des cercles concentriques (Figure 50). Les deux encres ont été étalées sur deux lames donneuses différentes puis les lames ont été chargées en même temps dans la machine avant l'impression. Les cellules colorées à la calcéine ont permis d'imprimer le cercle interne (1,2 mm de diamètre) et les cellules colorées au Dil-LDL ont été utilisées pour imprimer le cercle externe (1,6mm de diamètre).

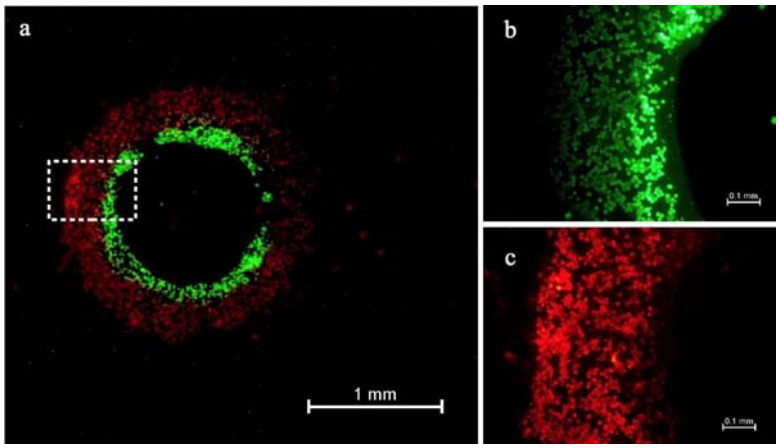


Figure 50: Impression séquentielle en 2D de cellules Ea-hy926. (a): Cercle interne coloration à la calcéine; (b): Cercle externe, coloration au Dil-LDL; (c): La superposition des 2 images montre une zone de recouvrement entre les deux cercles due à la coalescence de leur interface

B: Impressions en 3 dimensions

Pour réaliser des structures tridimensionnelles par une méthode de fabrication « couche par couche », deux approches ont été testées dans ce travail:

Dans le premier cas, le substitut osseux a été réalisé seulement avec l'encre de nHA imprimée en couches superposées: les résultats ont été évalués à la fois *in vitro* et *in vivo* chez la souris. Les limites de cette approche était un manque de propriétés mécaniques et une absence de porosités dans les matériaux imprimés.

Dans la seconde approche, nous avons utilisé des membranes de polycaprolactone (PCL) comme support d'impression afin d'améliorer les propriétés mécaniques de la construction et pour apporter des porosités au sein de la construction 3D.. Ces membranes étaient superposées alternativement avec des cellules imprimées par LAB. Les résultats *in vitro* et *in vivo* ont montré que les constructions 3D structurées par des membranes de PCL ont favorisé la prolifération cellulaire par rapport à un matériau non sructuré.

1. Expérimentations in vitro :

1.1. Superposition de couches d'hydroxyapatite

L'objectif de cette étude était de réaliser une structure tridimensionnelle *in vitro* grâce à des impressions de couches superposées de l'encre de nHA préparée et caractérisée précédemment (Page 55).

L'encre d'hydroxyapatite a été imprimée en couches successives superposées puis les résultats ont été observés en microscopie optique et en MEB. Un motif en « escalier » a été réalisé en superposant 5, 10 ou 15 couches de matériau sous la forme de rectangles scannés. On peut visualiser les différentes zones d'impression en MO (Figure 51.

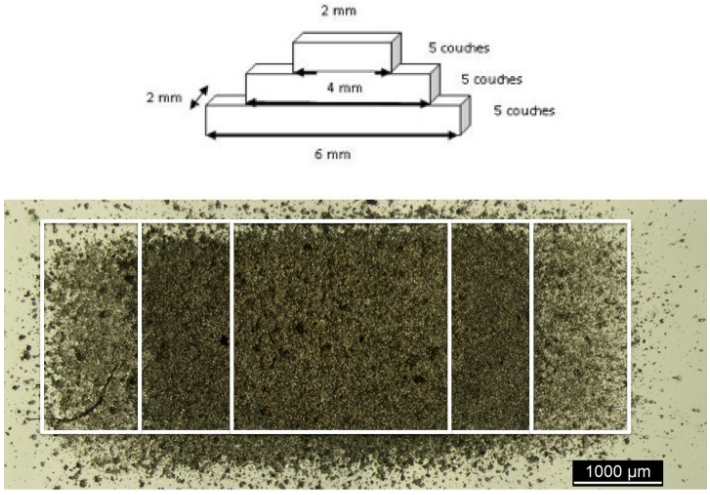


Figure 51: Schéma du motif imprimé en 3D avec nHA et résultat de l'impression observé en Microscopie Optique

A plus fort grossissement (MEB), on peut voir la surface du matériau imprimé. Celle-ci présente une rugosité importante et une très faible porosité: les particules de nHA apparaissent fortement compactées et de rares pores sont présents (Figure 52).

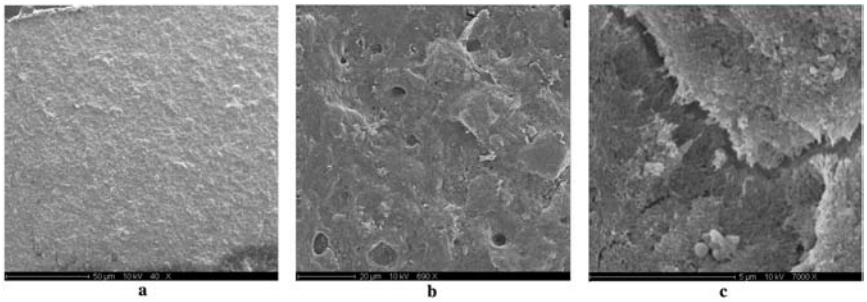


Figure 52: Observation en MEB de la surface de nHA imprimée. Grossissement de 40 x (a), 690 x (b) et 7000 x (c)

La tranche de la construction a également été observée en MEB: L'impression a été faite sur un ruban adhésif qui a été retiré après impression, laissant la tranche apparente (Figure 53).

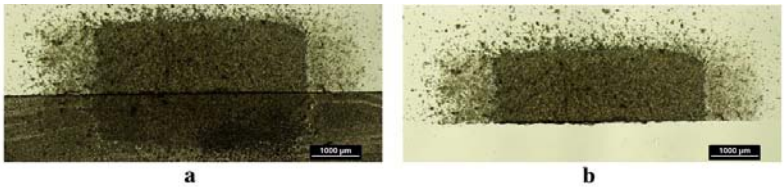


Figure 53: Impression d'hydroxyapatite sur ruban adhésif pour visualiser la tranche du matériau imprimé (a: impression sur scotch; b: résultat après retrait du scotch)

Au centre de la construction, une épaisseur de 45µm environ a été mesurée, ce qui correspond à l'impression de 15 couches de matériau. Dans la partie la plus externe de l'escalier (5 couches), l'épaisseur de matériau est beaucoup plus faible (Figure 54)

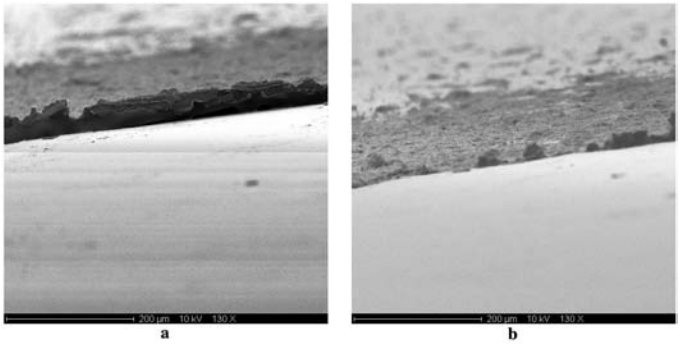


Figure 54: Observation de la tranche de 15 couches (a) et de 5 couches (b) de nHA imprimées sur verre

1.2. Impressions de cellules sur des membranes de PCL tissées par électrospinning

Les membranes de PCL utilisées dans ce travail ont été fournies par le laboratoire de régénération tissulaire de l'université de Twente aux Pays Bas sous la forme de feuilles de 20 cm x 10 cm de coté (Annexe, Page 147). Les membranes avaient une épaisseur de 100 µm environ et chaque fibre avait un diamètre compris entre 4 µm et 5 µm (Figure 55).

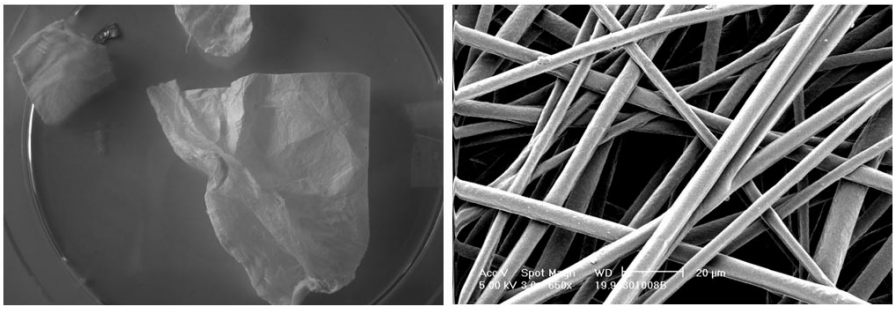


Figure 55: Membranes de PCL (a: vue macroscopique; b: observation en MEB: image Université de Twente)

Une encre de cellules MG63 (Solution de 50.10^6 cellules/ml dans le milieu IMDM, supplémentée avec 1% d'alginate) a été imprimée sur une membrane de PCL sous la forme de cercles, puis l'ensemble a été mis en culture pendant 7 jours. On peut observer les cercles juste après impression sur une vue macroscopique (Figure 56 a). Après 7 jours de culture, les cellules étaient marquées positivement au test du Live/Dead et le motif imprimé pouvait encore être observé (Figure 56 b). Les vues à plus fort grossissement montrent les rapports étroits entre les cellules et les fibres de PCL (Figure 56 c-d).

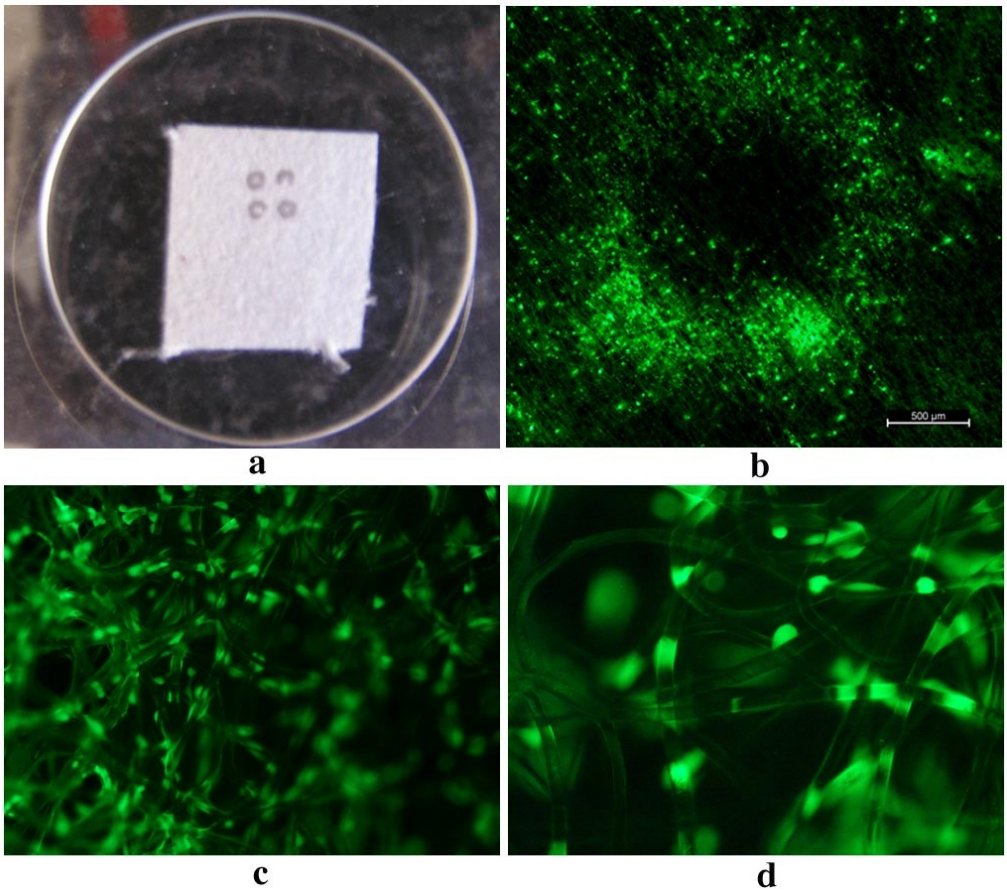


Figure 56: Impression de cellules MG63 sur une membrane de PCL (a: vue macroscopique initiale après impression; b: vue d'un cercle de MG63 marqué au Live/Dead après 7 jours de culture; c: Observation après 7 jours de culture x10; d: Observation après 7 jours de culture x20)

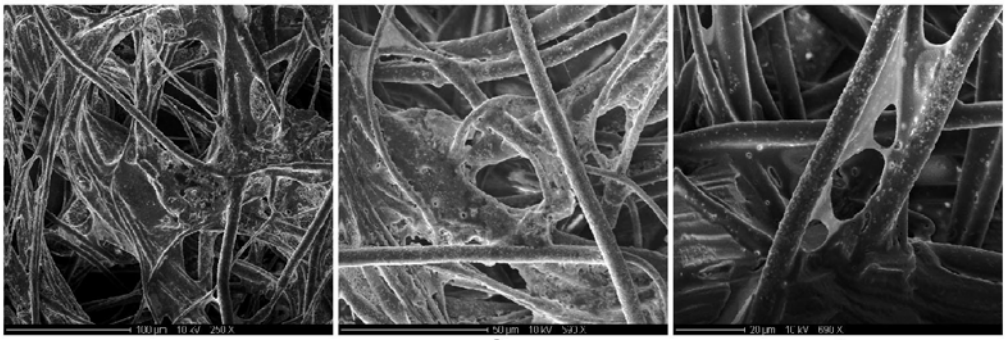


Figure 57: Observation en MEB des cellules MG63 imprimées sur PCL après 7 jours de culture

L'observation en MEB des cellules MG63 imprimées sur les membranes de PCL a montré après 7 jours de culture l'étalement des cellules sur le matériau (Figure 57).

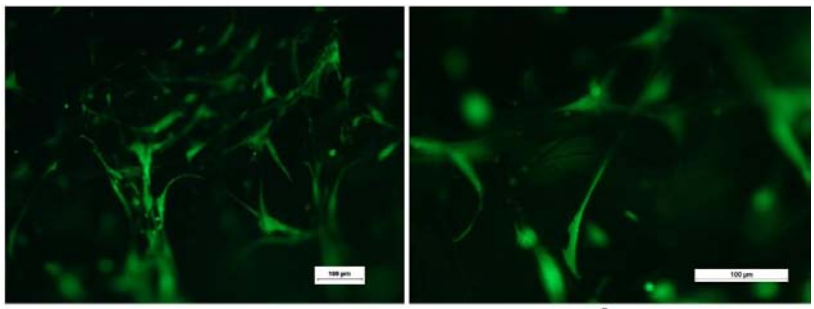


Figure 58: Cellules ADSC imprimées sur PCL (a: Marquage au Live/Dead après 6 jours de culture x10; b: Marquage au Live/Dead après 6 jours de culture x20)

Les cellules ADSC ont également été imprimées sur PCL et on a pu observer après 6 jours de culture une réponse positive au Live/Dead et un étalement important des cellules sur les fibres de PCL (Figure 58).

2. IMPLANTATIONS IN VIVO DE MATÉRIAUX FABRIQUÉS PAR LAB

2.1. Etude Préliminaire: Evaluation de la prolifération sous cutanée de MG63-Luc et d'ADSC-Luc chez la souris NOG

L'objectif de cette étude préliminaire était d'évaluer la prolifération sous cutanée de deux types cellulaires différents (MG63-Luc ou ADSC-Luc) après implantation chez la souris NOG. Cette expérimentation devait permettre de choisir un type cellulaire pour la fabrication et l'implantation des matériaux composites PCL-Cellules chez la souris NOG.

Les deux types cellulaires étaient transfectées par le gène de la luciférase afin de localiser les cellules et de quantifier leur prolifération au cours du temps. Les culots cellulaires ont été suspendus dans du milieu de culture sans sérum avant l'injection sous cutanée (IMDM pour les MG63 et DMEM-F12 pour les ADSC).

Les cellules ont été implantées de façon bilatérale chez les souris avec une seule condition par souris. Cinq souris ont donc été utilisées pour tester les 5 conditions déterminées. Les quantités de cellules MG63 implantées étaient de $6,10^6$/ml; $3,10^6$/ml; $2,10^6$/ml; $1,10^6$/ml ou $0,5.10^6$/ml. Les quantités de cellules ADSC implantées étaient de $3,10^6$/ml; $2,10^6$/ml; $1,10^6$/ml; $0,5.10^6$/ml ou $0,25.10^6$/ml. Les cellules ont été implantées de façon très localisée, ce qui a permis la formation de nodules tumoraux. La prolifération des cellules a été évaluée par un suivi hebdomadaire comprenant une mesure des tumeurs avec un pied à coulisse micrométrique et une quantification de la prolifération par photon imageur.

Le suivi du volume des nodules de cellules ADSC implantés en sous cutané a montré que dans toutes les conditions étudiées, la quantité de cellules diminuait au cours du temps. Cette tendance était plus marquée lorsque peu de cellules avaient été implantées ($1,10^6$/ml; $0,5.10^6$/ml ou $0,25.10^6$/ml). A l'inverse, dans toutes les conditions étudiées, les nodules de cellules MG63 ont augmenté ou sont restés stables avec des volumes au moins 3 fois plus importants que les ADSC dans les mêmes conditions (Figure 59).

Après 1 mois de suivi, les animaux ont été sacrifiés et les tissus sous cutanés ont été prélevés lorsque des nodules tumoraux étaient visibles. Les tissus ont été préparés en histologie conventionnelle (paraffine) et colorés à l'HES avant observation en microscopie optique.

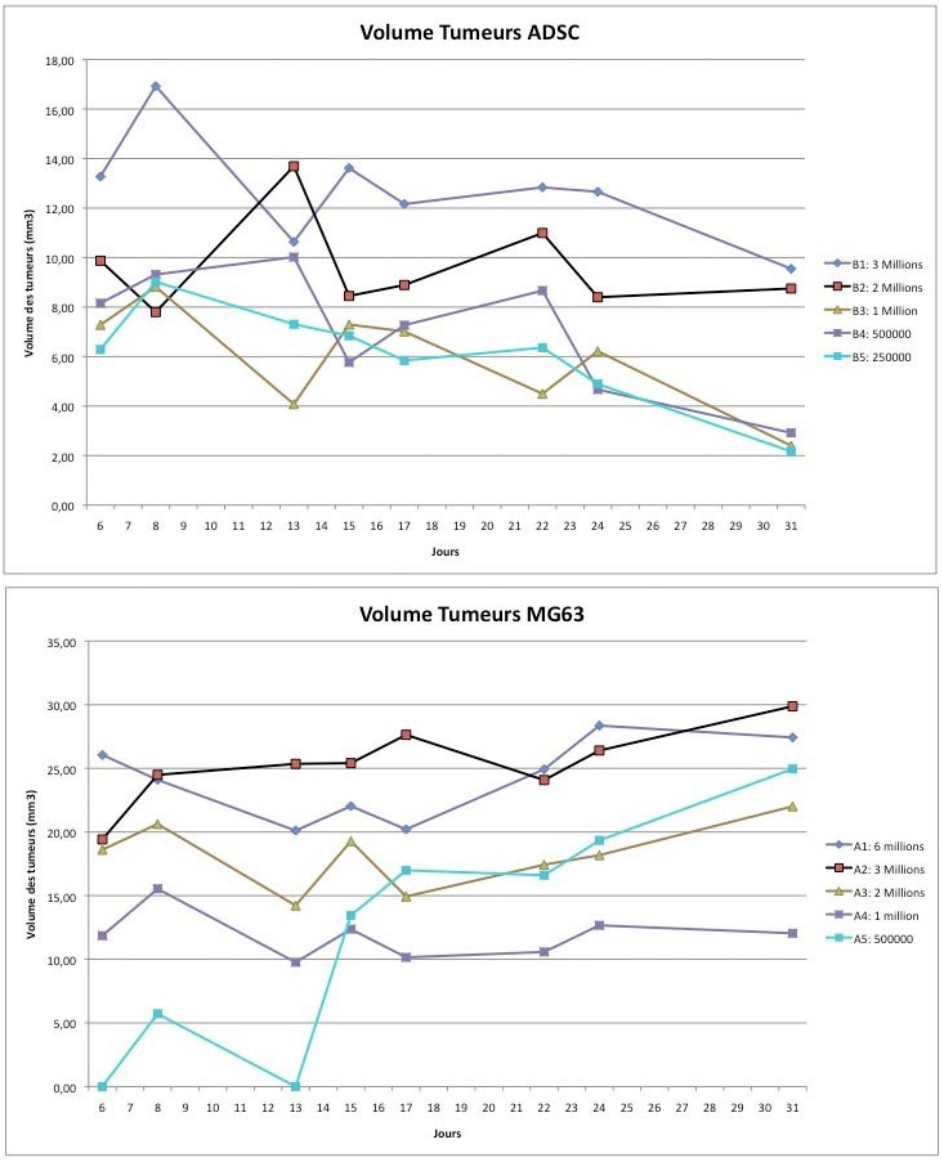


Figure 59: Suivi du volume des tumeurs induites par l'injection sous cutanée de cellules ADSC ou MG63

Le suivi au photon-imageur de la prolifération des cellules luminescentes implantées en sous cutané confirme la tendance observée sur la mesure du volume des tumeurs. En effet, on observe que la prolifération des cellules MG63 est beaucoup plus intense que la prolifération des cellules ADSC-Luc, quelle que soit la quantité de cellules implantées (Figure 60).

La prolifération des cellules ADSC-Luc est faible dans les conditions étudiées: en effet, la quantification de la prolifération au photon-imageur montre une diminution rapide de la quantité de cellules après implantation, ce qui va dans le sens d'une faible survie cellulaire dans ces conditions. A l'inverse, la quantité de cellules MG63-Luc est restée stable ou a légèrement augmenté au cours de l'expérimentation (Figure 61).

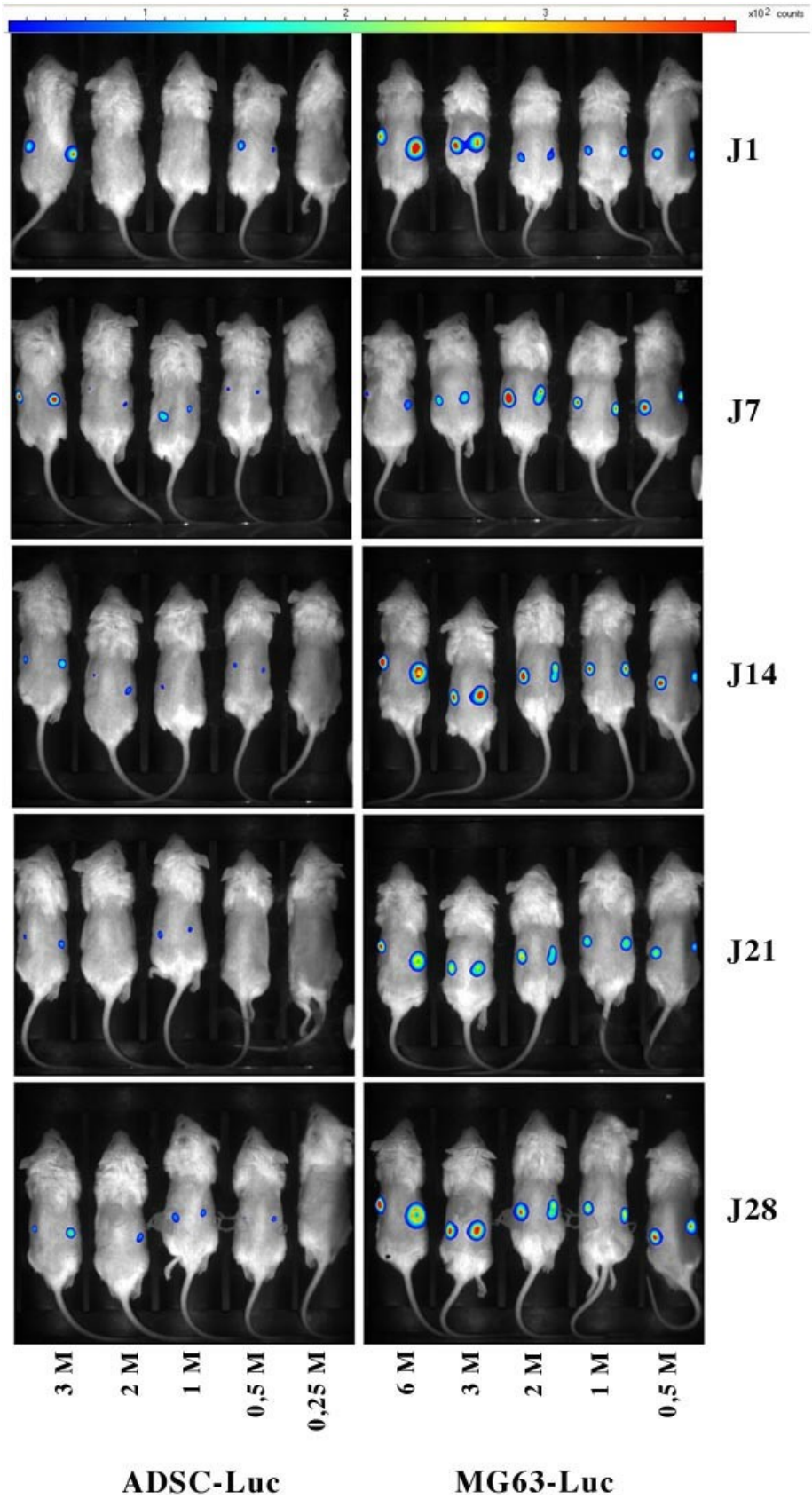


Figure 60: Suivi au photon imageur de la prolifération des cellules ADSC-Luc et MG63-Luc implantées en sous-cutané (a: 1jour; b: 7 jours; c: 14 jours; d: 21 jours; e: 28 jours) (le seuillage utilisé sur les images est identique à tous les temps)

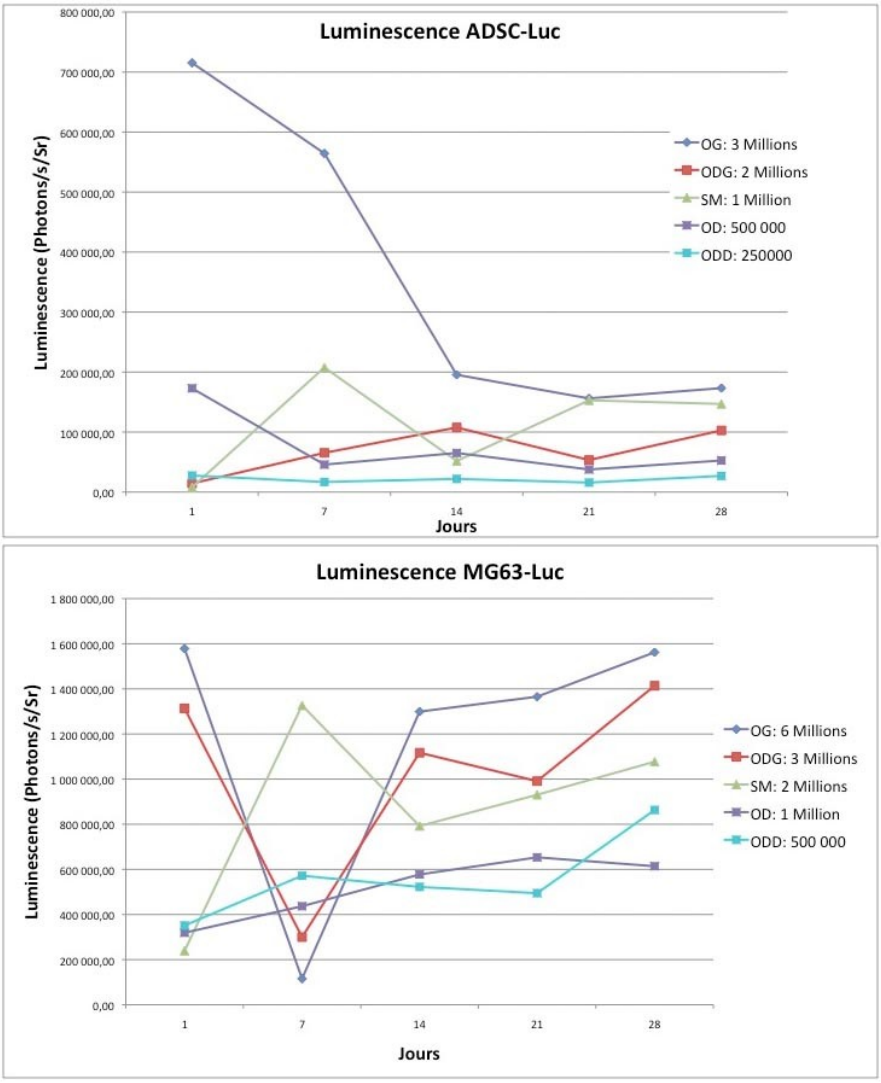


Figure 61: Quantification de la prolifération des cellules ADSC-Luc et des cellules MG63-Luc au photon imageur

Chez toutes les souris ayant reçu des cellules MG63-Luc, des nodules fermes ont été prélevés en fin d'expérimentation. Dans le cas des cellules ADSC-Luc, les nodules n'ont pu être prélevés que lorsque des quantités importantes de cellules avaient été injectées en début d'expérimentation (2.10^6 ou 3.10^6 de cellules). Dans les trois autres conditions, les nodules n'étaient plus visibles en fin d'expérimentation. Dans les nodules de MG63-Luc, l'analyse histologique a révélé la présence de fines travées osseuses au sein de cellules et de tissu fibreux, mais de larges zones d'os mature étaient également présentes (Figure 62). Dans le cas des nodules d'ADSC-Luc, quelques éléments pouvant correspondre à de fines travées osseuses éparses ont également été observées au sein du tissu adipeux (Figure 63 a) ou à proximité de fibres musculaires (Figure 63 b).

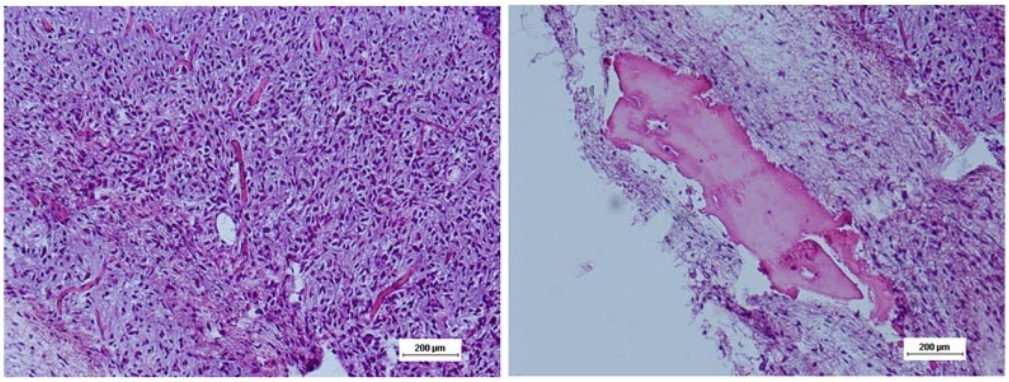


Figure 62: Histologie d'un nodule MG63-Luc montrant de fines travées osseuses immatures (flèche) au sein d'un tissu fibreux (a) et une travée osseuse mature (b)

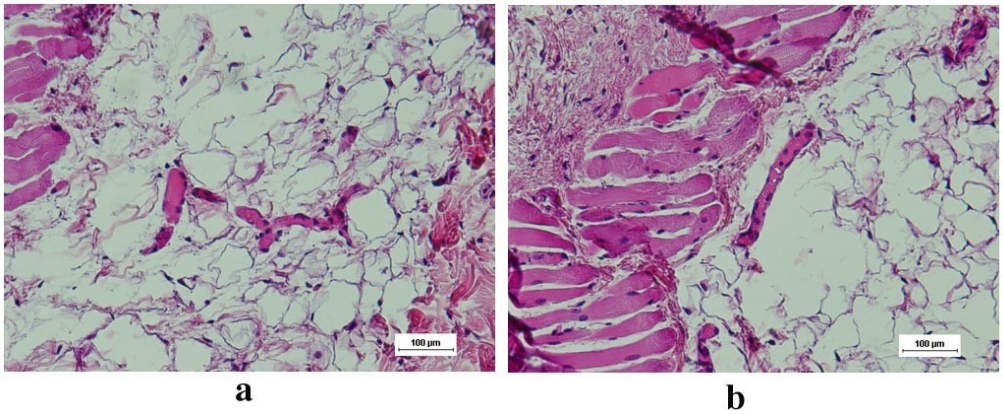


Figure 63: Histologie d'un nodule ADSC-Luc montrant de fines travées osseuses immatures (flèches) au sein du tissu adipeux (a) ou à proximité de tissu musculaire (b)

A l'issue de cette expérience préliminaire, les cellules MG63 ont été choisies comme modèle cellulaire *in vivo* pour évaluer l'impact de l'organisation interne du matériau sur la prolifération cellulaire et la néoformation osseuse.

2.2. Implantation de matériaux cellularisés par LAB en site pariétal chez la souris

L'objectif principal de cette étude comparative *in vivo* était d'évaluer l'intérêt de la biofabrication couche par couche par rapport à l'ensemencement en masse d'un matériau, afin de favoriser la prolifération cellulaire et la néoformation osseuse. Les objectifs secondaires étaient d'utiliser les membranes de PCL comme support de construction 3D multi-couches mais également d'évaluer l'intérêt d'utiliser les cellules MG63 *in vivo* comme modèle de prolifération cellulaire.

Dans les deux conditions comparées, les assemblages étaient composés de membranes de PCL de 4 mm de diamètre superposées et de cellules MG63-Luc imprimées par LAB. Dans tous les cas, les membranes de PCL étaient imprégnées de Matrigel® avant l'impression des cellules. L'encre de cellules MG63-Luc était composée de 50 millions de cellules/ml, suspendues dans du milieu IMDM et supplémentée avec 1% d'alginate (w/v). Dans chaque couche de cellules imprimées, nous avons transféré environ 30000 cellules. En effet, nous avons imprimé des matrices de gouttes espacées de 200 µm (chaque goutte contenait environ

50 cellules) sur une surface de PCL de 20 mm^2.

L'assemblage « Test » (*modèle de fabrication couche par couche*) était composé de 3 membranes de PCL superposées, entre lesquelles des cellules MG63 étaient imprimées, puis une dernière couche de cellules était imprimée sur le dessus. L'assemblage « Témoin » était composé de 3 membranes de PCL superposés sur lesquelles 3 couches de cellules étaient imprimées (*modèle d'ensemencement*). Dans les 2 cas, la même quantité de cellules a été imprimée, mais elles ont été réparties différemment, *à l'intérieur* (Test) ou *sur* (Témoin) le matériau (Figure 64). Les matériaux ont été incubés *in vitro* 24 heures avant implantation pour permettre l'attachement des cellules imprimées.

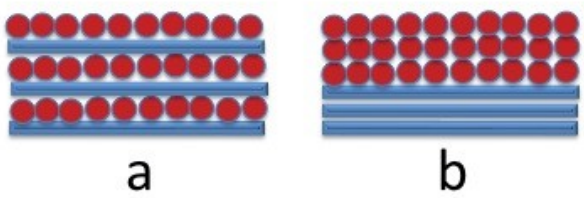


Figure 64: Schéma des assemblages comparés. Dans le modèle d'ensemencement, les cellules sont imprimées sur les 3 membranes superposées (Gauche). Dans le modèle de construction couche par couche, les cellules sont imprimées entre les membranes de PCL (Droite).

Les implantations ont ensuite été réalisées chez 20 souris NOG, dans des défauts osseux de calvaria de 4,7 mm de diamètre. Les animaux ont été répartis en 2 groupes et sacrifiés après 1 mois (n=10) ou 2 mois (n=10). La prolifération cellulaire a été suivie au cours de l'expérimentation par photon-imageur. Après sacrifice, les échantillons ont été observés en micro-scanner (n=20) pour quantifier la néo-formation osseuse dans les défauts osseux et en histologie décalcifiée (n=10) pour évaluer la nature des tissus présents.

Les observations en photon-imageur ont montré que la prolifération cellulaire était plus importante du coté Test (cellules imprimées entre les couches de PCL) que du coté témoin (Impression des cellules sur les trois membranes de PCL superposées). La Figure 65 montre ainsi un groupe de 5 souris suivies pendant 2 mois chez qui les deux types d'assemblages ont été implantés dans des défauts osseux de calvaria. On voit que la prolifération cellulaire est plus importante du coté Test (Construction couche par couche) que du coté Témoin (Impression des cellules sur les 3 membranes superposées).

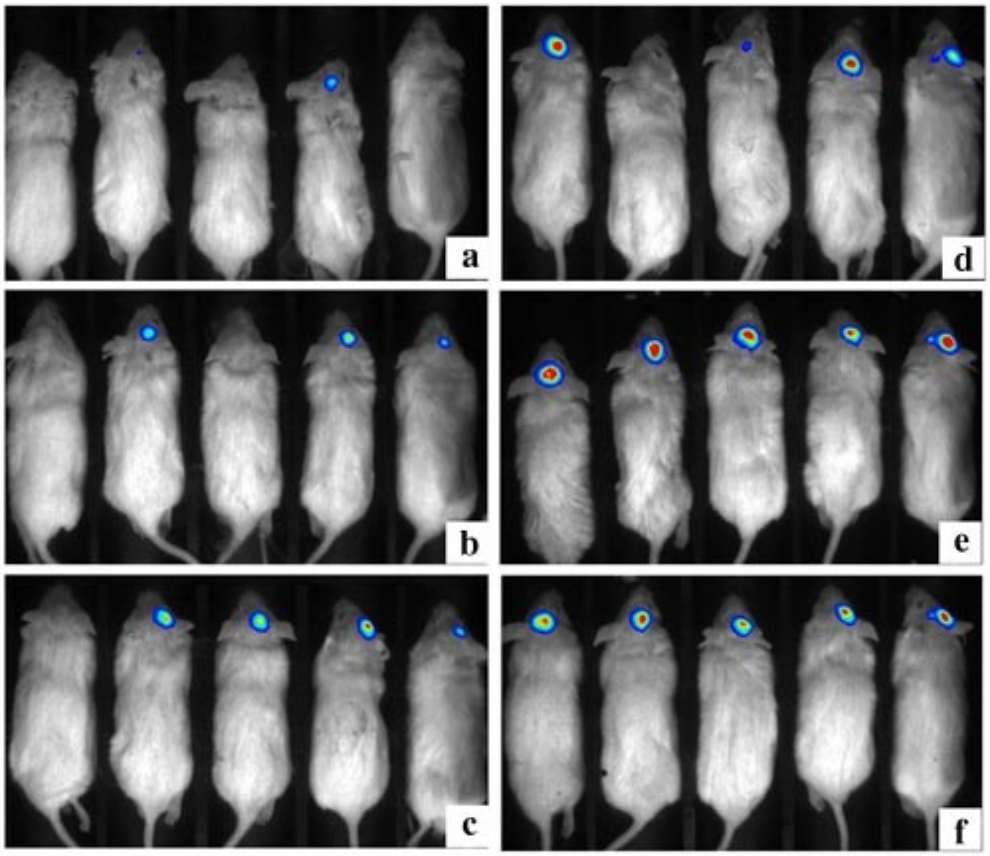


Figure 65: Suivi par bio-luminescence de la prolifération de cellules MG63 imprimées sur des membranes de PCL et implantées dans des défauts osseux de calvaria chez la souris NOG. La prolifération est plus importante du coté test (droit) que du coté témoin (gauche). Suivi à J7 (a); J14 (b); J21 (c); J28 (d); J49 (e) et J56 (f); (le seuillage utilisé sur les images est identique à tous les temps).

La quantification de la prolifération cellulaire chez les 20 souris montre une prolifération significativement plus importante du coté test que du coté témoin à tous les temps étudiés (Test de Wilcoxon, seuil de significativité à 0,25%) (Figure 66).

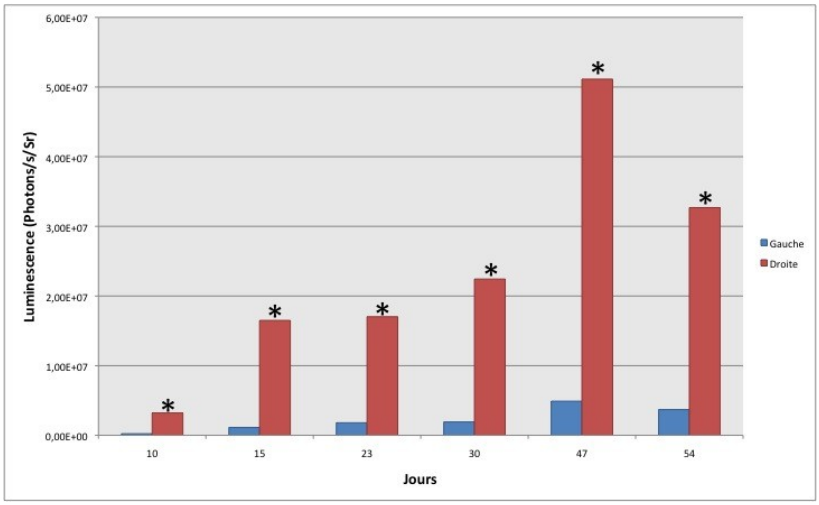


Figure 66: Quantification de la Prolifération cellulaire par Photon Imageur. Droite: coté Test; Gauche: Coté Témoin. Les différences sont significatives (*) à tous les temps étudiés (Test de Wilcoxon)

Du coté Test, la prolifération cellulaire a augmenté régulièrement jusqu'au 47e jour. La différence était significative entre le 10e jour et tous les autres temps. Des différences significatives ont également été retrouvées entre le 15e et le 47e jour, entre le 23e et le 47e jour et entre le 30e et le 47e jour. La diminution observée entre le 47e et le 54e jour n'est pas significative (Figure 67, Tableau 5) (Test de Mann-Whitney, seuil de significativité à 5%).

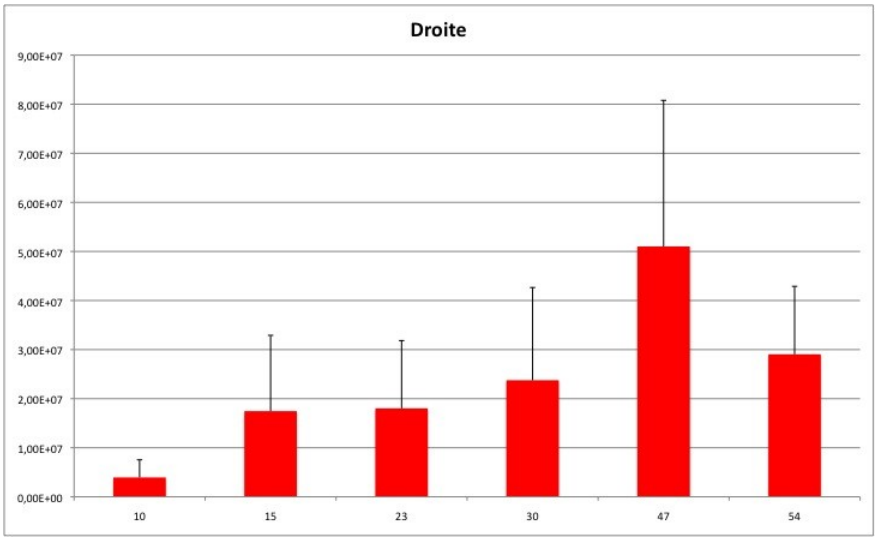


Figure 67: Quantification de la prolifération cellulaire au photon imageur du coté test

	J15	J23	J30	J47	J54
J10	S / p=1,26 %	S / p=0,27%	S / p=0,5 %	S / p=0,07 %	S / p=0,14%
J15	-	NS / p=33,34%	NS / p=21,92%	S / p=1,21 %	NS / p=3,44%
J23	-	-	NS / p=22,95%	S / p=1,02%	NS / p=5,37%
J30	-	-	-	S / p=2,27%	NS / p=28,77%
J47	-	-	-	-	NS / p=5,8%

Tableau 5: Résultats des tests statistiques pour le coté Test (Mann-Whitney)

(S: Différence Significative; NS: Différence non Significative)

Du coté témoin, la prolifération cellulaire est 10 fois moins importante que du coté test (Figure 68, Tableau 6). Les différences entre le 10e jour et tous les autres temps sont significatives. Les différences entre le 15e et le 30e, le 47e et le 54e jour sont également significatives. La différence entre le 23e et le 47e jour est significative. En revanche, la diminution entre le 47e et le 54e jour n'est pas significative (Test de Mann-Whitney, seuil de significativité à 5%).

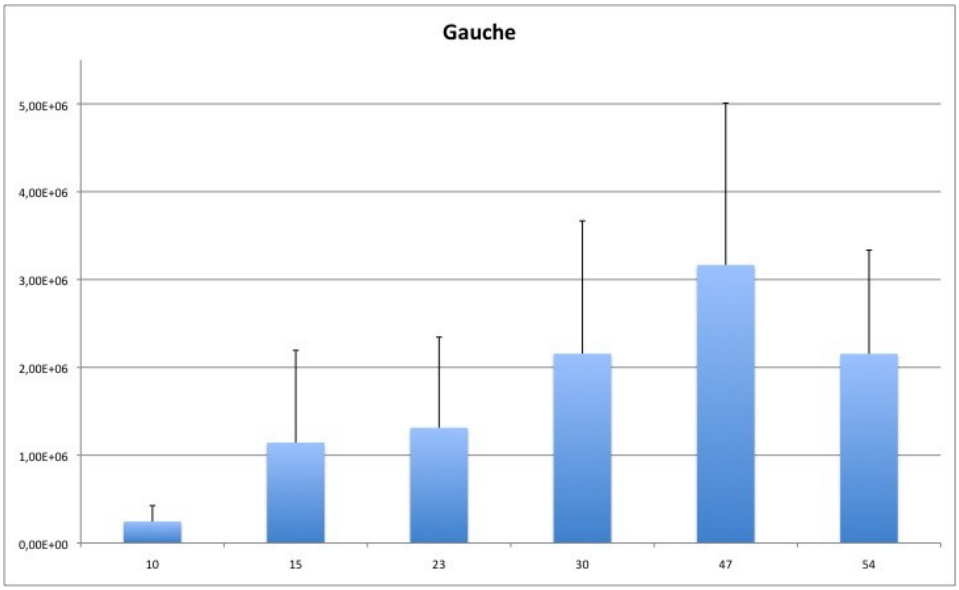


Figure 68: Quantification de la prolifération cellulaire au photon imageur du coté témoin

	J15	J23	J30	J47	J54
J10	S / p=0,02%	S / p=0,02%	S / p=0,01%	S / p=0,03%	S / p=0,14%
J15	-	NS / p=31,21%	S / p=3,52%	S / p=0,46%	S / p=2,63%
J23	-	-	NS / p=5,86%	S / p=0,54%	NS / p=5,44%
J30	-	-	-	NS / p=5,65%	NS / p=47,34%
J47	-	-	-	-	NS / p=11,17%

Tableau 6: Résultats des tests statistiques pour le coté Témoin (Mann-Whitney)

(S: Différence Significative; NS: Différence non Significative)

Les observations en micro-scanner n'ont pas montré d'os néo-formé dans aucune des conditions étudiées, ni dans le groupe à 1 mois, ni dans le groupe à 2 mois de cicatrisation (Figure 69). La comparaison du BV/TV dans la zone d'intérêt est significativement plus basse par rapport à un os témoin non opéré (Test . Après 2 mois de cicatrisation, la quantification du BV/TV (Rapport du volume osseux sur le volume total de l'échantillon dans la zone d'intérêt) ne montre pas de différence entre le coté test et le coté témoin (Test de Wilcoxon, seuil de significativité à 0,25%) (Figure 70).

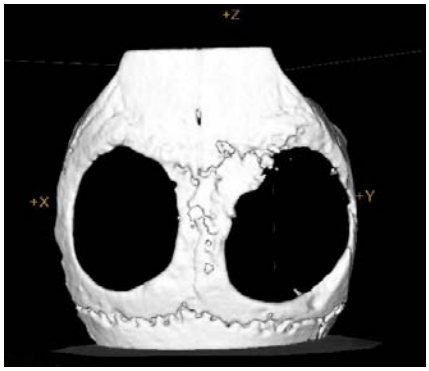


Figure 69: Observation en Micro-scanner d'un échantillon 2 mois après la greffe. Il n'y a pas de reconstruction osseuse ni du coté test (droite), ni du coté témoin (gauche)

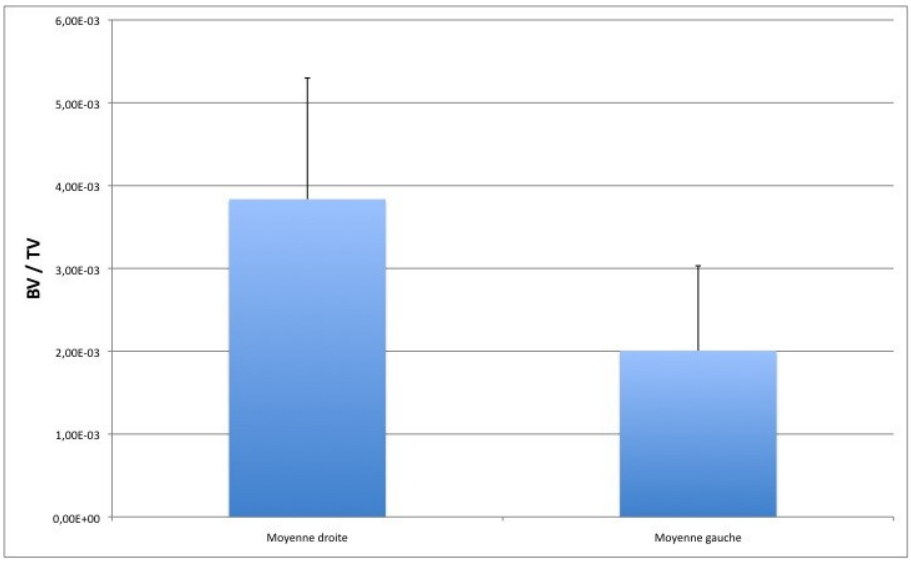


Figure 70: Quantification du volume osseux dans le volume total de la zone d'intérêt (BV/TV) à 2 mois. Il n'y a pas de différence entre les 2 conditions de l'étude (Test de Wilcoxon)

L'analyse en histologie décalcifiée n'a pas montré de réparation osseuse sur les échantillons étudiés ni à 1 mois, ni à 2 mois.

Après 1 mois de cicatrisation, on n'observe pas d'os néoformé ni du coté test, ni du coté témoin. Cependant, l'épaisseur du tissu au niveau des défauts osseux est beaucoup plus importante du coté test que du coté témoin Figure 71. A plus fort grossissement, on observe du coté témoin un tissu fibreux fin et peu cellularisé avec des résidus de la membrane de PCL (Figure 72 a). Du coté test, le tissu fibreux est très dense avec beaucoup de cellules et on observe également quelques nodules minéralisés (Figure 72 b).

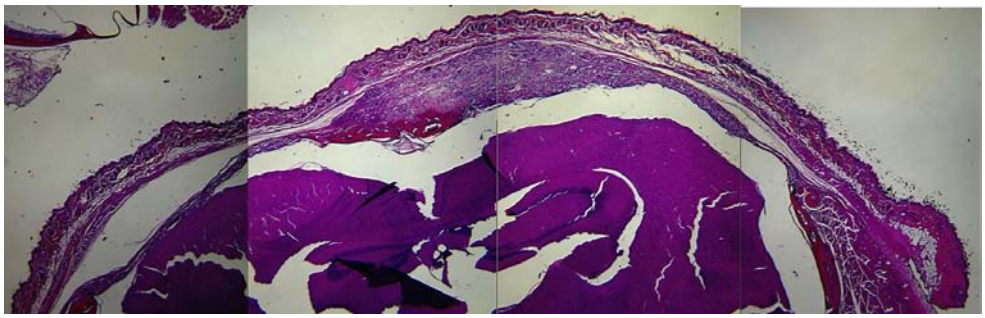


Figure 71: Coupe frontale de calvaria après 1 mois de cicatrisation. L'épaisseur du matériau cellularisé est plus importante du coté test (flèche) que du coté témoin (Histologie décalcifiée, HES X2)

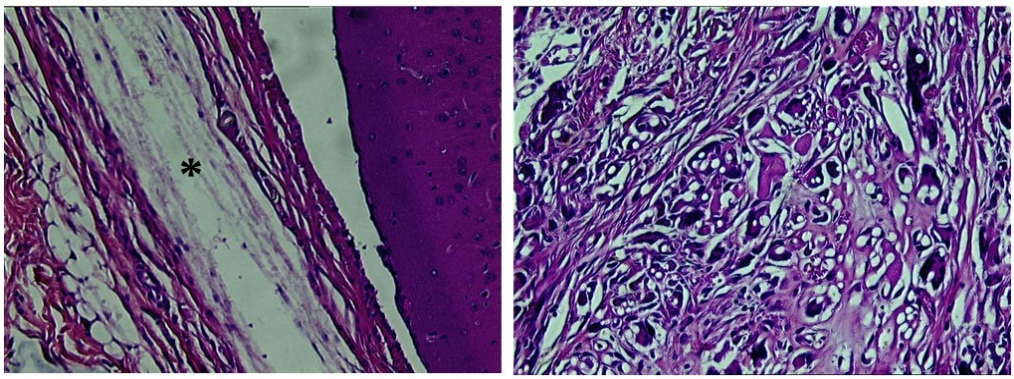


Figure 72:Aspects du tissu néo-formé du coté contrôle (a) et du coté test (b). Des résidus de PCL sont visibles coté contrôle (*) et des nodules minéralisés sont observés coté test (flèche) (Histologie décalcifiée, HES X20)

Après 2 mois de cicatrisation, on n'observe pas d'os néoformé ni du coté test, ni du coté témoin. L'épaisseur du tissu fibreux est similaire des 2 cotés Figure 73.

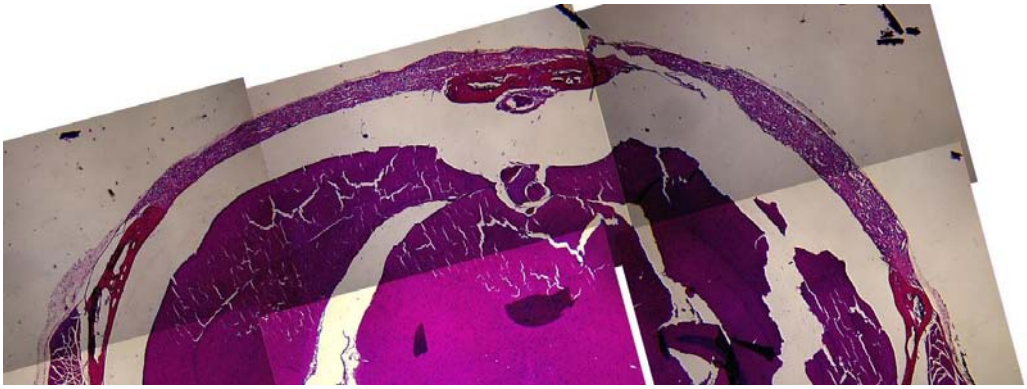


Figure 73: Coupe frontale de calvaria après 2 mois de cicatrisation. (Histologie décalcifiée, HES X2)

A plus fort grossissement, on observe encore des résidus de PCL du coté témoin (Figure 74 a). L'aspect du tissu fibreux est similaire du coté test et du coté témoin (Figure 74 b).

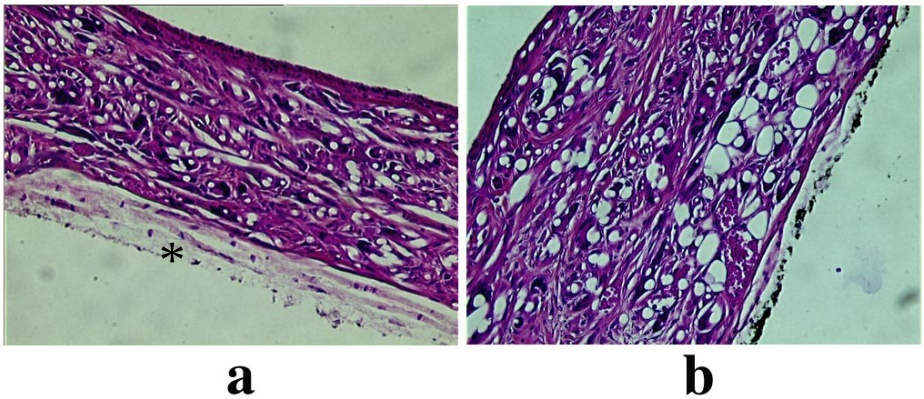


Figure 74: Aspects du tissu néo-formé du coté contrôle (a) et du coté test (b). Quelques résidus de PCL sont visibles coté contrôle (*) (Histologie décalcifiée, HES X20)

3. IMPRESSIONS IN VIVO ET IN SITU

3.1. Impression in vivo de nHA chez la souris C57-Black

L'objectif principal de l'étude était de montrer la faisabilité de l'impression *in vivo* et *in situ* chez la souris avec le système LAB. Les objectifs secondaires étaient d'une part d'observer l'effet du laser utilisé (1064 nm) sur le tissu nerveux exposé à l'irradiation et d'autre part d'évaluer la réparation osseuse obtenue sur les défauts osseux critiques de calvaria après impression de nHA *in vivo* et *in situ*.

L'étape préliminaire à la réalisation des expérimentations *in vivo* et *in situ* chez la souris était de modifier le module receveur et de fabriquer un portoir permettant de placer les animaux à la place de la lame receveuse (Figure 75).

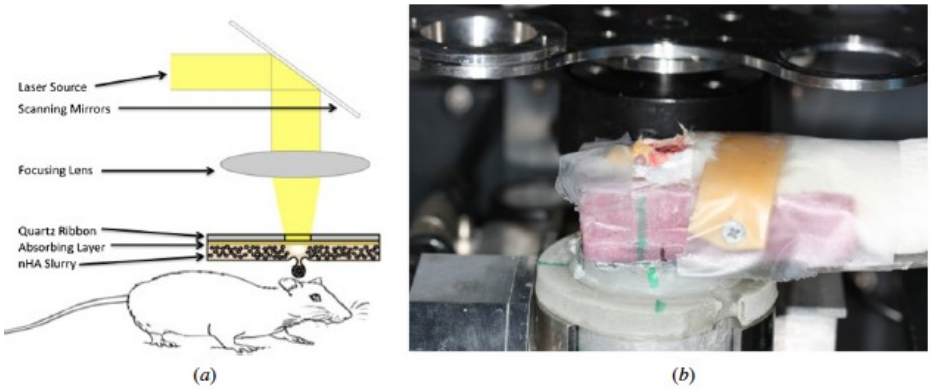


Figure 75: Adaptation du module receveur permettant de réaliser des impressions in vivo dans des défauts osseux de calvaria de souris

Pour évaluer les effets du laser utilisé (longueur d'onde = 1064 nm) sur les tissus nerveux (méninges et encéphale), nous avons mené une expérimentation préliminaire sur 6 souris OF-1 mâles. Les défauts osseux critiques ont été réalisés sur les calvarias, puis les souris ont été placées dans la station de travail et elles ont reçu une irradiation focalisée sur les méninges dans les mêmes conditions laser que pour les impressions de nHA. Le suivi de ces souris par micro-IRM *in vivo* a montré qu'une inflammation était présente au niveau du coté irradié après 1 semaine (Figure 76 a), mais que cette inflammation avait régressé après 15 jours (Figure 76 b).

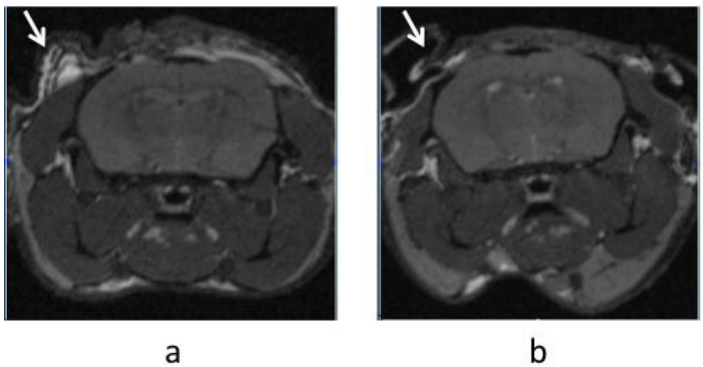


Figure 76: Suivi par IRM de l'inflammation au niveau de la dure mère après une irradiation laser focalisée dans des défauts osseux de calvaria (a: observation après 1 semaine; b: observation après 2 semaines)

Après sacrifice des animaux (15 jours), l'observation de la dure mère en histologie décalcifiée (Figure 77) n'a pas montré d'inflammation résiduelle ni de zone nécrotique dans les tissus nerveux.

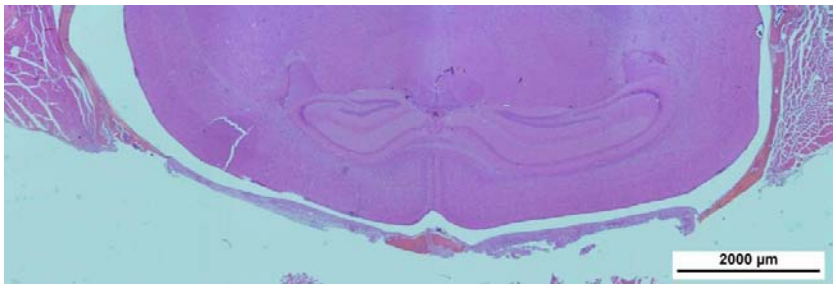


Figure 77: Coupe en histologie décalcifiée de la calvaria de souris 15 jours après une irradiation laser focalisée sur la dure mère

Pour les impressions de nHA *in vivo* et *in situ*, nous avons utilisé l'encre de nHA qui a été stérilisée aux UV pendant 30 minutes. Elle a été étalée sur le lame donneuse dans les mêmes conditions qui décrit précédemment.

Les défauts osseux bilatéraux de calvaria ont été réalisés puis la souris a été placée dans le laser. L'espace entre la lame donneuse et la surface de la dure mère était de 1500 µm. La focalisation sur la lame donneuse et sur la surface de la dure mère était réalisée grâce à la caméra intégrée à la station de travail. Les paramètres d'impressions étaient les suivants: Fréquence 5 kHz, Energie 12 µJ, Vitesse des scanners 400 mm/s. Nous avons imprimé 30 couches superposées de nHA dans un des deux défauts osseux (test) tandis que le défaut controlatéral était laissé vide (témoin négatif).

Trente souris ont été inclues dans cette étude et elles ont toutes été opérées dans les conditions décrites ci -dessus. Les animaux ont été sacrifiés après 7 jours (n=10), 1 mois (n=10) ou 3 mois (n=10). Les méthodes d'analyse étaient l'histologie décalcifiée et une évaluation de la réparation osseuse par micro-scanner.

Les résultats de l'histologie décalcifiée ont montré que la nHA était présente dans les défauts osseux après impression, ce qui a confirmé qu'il était possible de réaliser des impressions *in vivo* et *in situ* chez la souris (Figure 78). Après 1 semaine de cicatrisation, on a observé la nHA au contact de la dure mère du coté test (Figure 78 a), ce qui montre que le matériau a bien été imprimé. Cependant, on a pu observer au même temps de cicatrisation la nHA du coté témoin, à distance de la dure mère (Figure 78 b), ce qui est probablement dû à une migration du matériau après impression. Après 1 mois de cicatrisation, de l'os néoformé a été observé du coté test (Figure 78 c) alors que du tissu fibreux était observé coté témoin (Figure 78 d). Ces éléments ont été confirmés après 3 mois de cicatrisation où un os mature était présent du coté test (Figure 78 e) alors que du tissu fibreux était présent coté témoin (Figure 78 f).

Les résultats en micro-scanner sur l'ensemble des animaux opérés ont partiellement confirmé ces résultats. En effet, il est apparu que les résultats étaient inconstants entre les échantillons et qu'ils étaient parfois contradictoires. La Figure 79 illustre ce phénomène: on peut voir une absence de reconstruction sur une souris à 1 mois (Figure 79 a), une reconstruction partielle sur une autre souris à 1 mois (Figure 79 b) et une absence complète de reconstruction sur une troisième souris à 3 mois (Figure 79 c). Ces observations ont ensuite été confirmées par les quantifications de la surface osseuse néo-formée sur les images de micro-scanner qui montrent qu'une réparation osseuse significative est présente aussi bien du coté test que du coté témoin (Figure 80). Par contre, il n'y a pas de différence significative pour la néo-

formation osseuse entre les deux cotés à aucun temps de l'expérimentation (Figure 81).

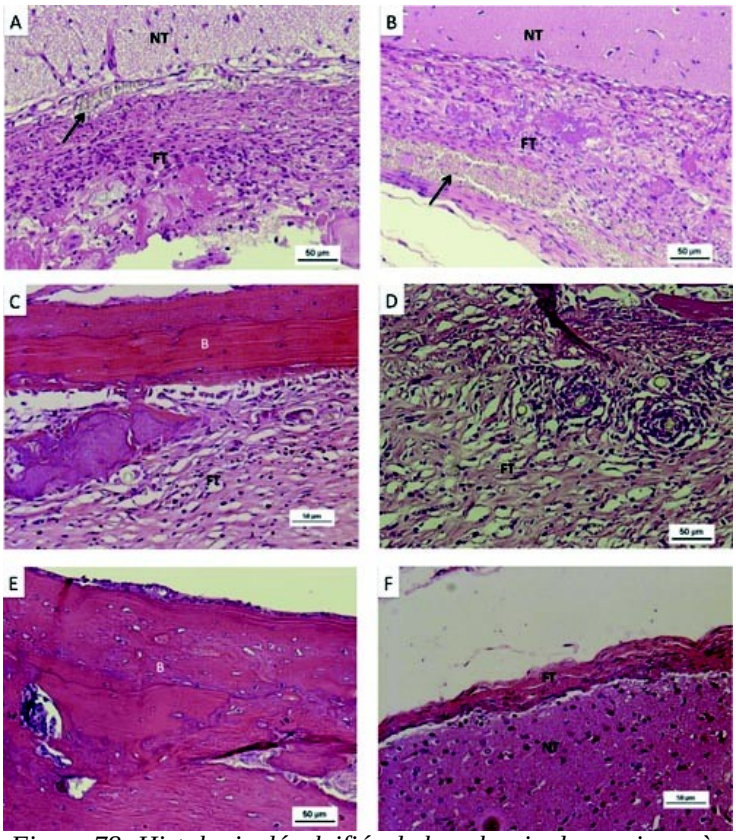


Figure 78: Histologie décalcifiée de la calvaria de souris après 1 semaine (a-b), 1 mois (c-d) et 3 mois (e-f) de cicatrisation. (a): coté test, 1 semaine: nHA imprimée au contact de la dure mère (flèche); (b); coté témoin, 1 semaine: nHA à distance de la dure mère; (c): coté test, 1 mois: Présence d'os mature et immature; (d): coté témoin, 1 mois: Présence de tissu fibreux; (e): coté test, 3 mois: Présence d''os mature; (f): Présence de tissu fibreux. (B: os; NT: Tissu nerveux; FT: Tissu Fibreux)

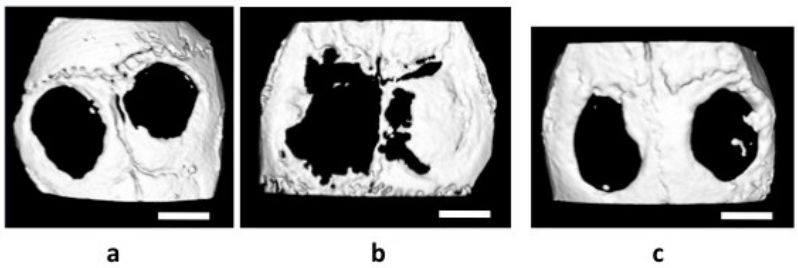


Figure 79: Images de micro-scanner obtenues après 1 semaine (a), 1 mois (b) et 3 mois (c) de cicatrisation après impression de nHA in vivo et in situ

La surface osseuse non reconstruite a été quantifiée de chaque coté au cours du temps à partir des images de micro-scanner analysées avec le logiciel image J®. Les tests statistiques ont été réalisés avec le test de Mann-Withney pour échantillons non appariés (Figure 80).

L'analyse des résultats montre du coté test (nHA imprimée dans les défauts osseux: Figure 80 a):

- Entre 1 semaine et 1 mois, la surface non reconstruite est significativement inférieure à 1 mois ($p<0,05$)
- Entre 1 mois et 3 mois, la surface non reconstruite est significativement inférieure à 3 mois ($p<0,01$)
- Entre 1 semaine et 3 mois, la surface non reconstruite est significativement inférieure à 3 mois ($p<0,01$)

L'analyse des résultats montre du coté témoin (pas de nHA imprimée: Figure 80 b):

- Entre 1 semaine et 1 mois, la surface non reconstruite est significativement inférieure à 1 mois ($p<0,01$)
- Entre 1 mois et 3 mois, il n'y a pas de différence significative de surface non reconstruite ($p>0,1$)
- Entre 1 semaine et 3 mois, la surface non reconstruite est significativement inférieure à 3 mois ($p<0,01$)

On observe donc une réduction significative au cours du temps de la surface osseuse non reconstruite aussi bien du coté test que du coté témoin.

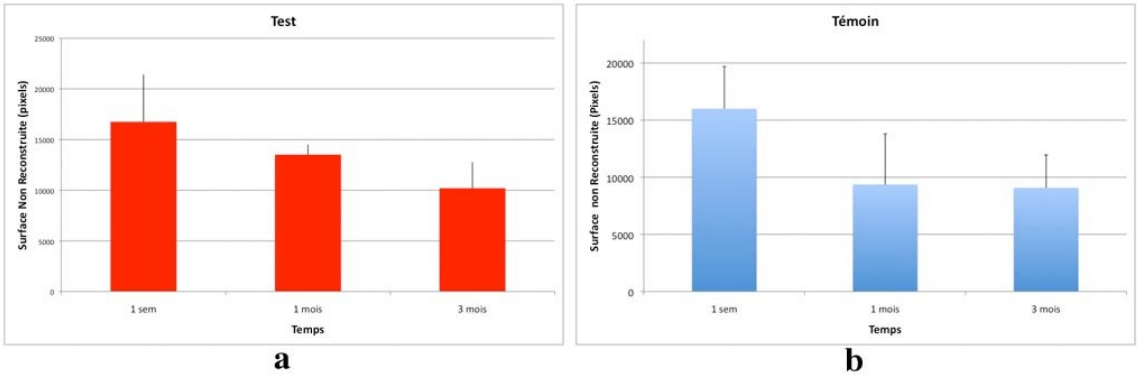


Figure 80: Quantification de la surface osseuse non reconstruite du coté test (a) et du coté témoin (b)

Pour la comparaison des résultats entre coté test et coté témoin comblé et non comblé à chaque temps, le test de Wilcoxon a été utilisé (échantillons appariés). Les résultats ne montrent pas de différence significative de la surface non reconstruite entre coté droit et gauche à 1 semaine, à 1 mois ni à 3 mois ($p>0,05$) (Figure 81). On peut donc conclure que la réparation osseuse entre coté test et coté témoin n'est pas différente. On peut également affirmer que le matériau implanté n'a pas eu d'effet significatif sur la réparation osseuse par rapport au coté contrôle.

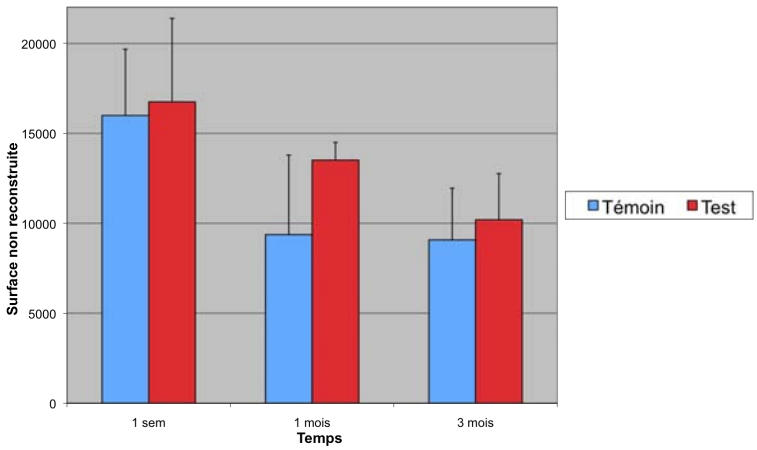


Figure 81: Comparaison au cours du temps de la reconstruction osseuse obtenue avec nHA imprimée in vivo et in situ

3.2. Impression in vivo de MG63 chez la souris "nude"

L'objectif de cette expérimentation était d'imprimer des cellules MG63 *in vivo* et *in situ* chez la souris Nude dans un défaut osseux de calvaria. Nous souhaitions confirmer la preuve de principe de l'impression *in vivo* et *in situ* démontrée précédemment avec l'impression de nHA dans les calvarias. Les objectifs secondaires étaient de limiter la migration des cellules imprimées grâce à une membrane de PCL tissée par electrospinning interposée, et de vérifier la viabilité et la prolifération cellulaire après impression *in vivo*.
Lors de la préparation du protocole, nous avons tenu compte des difficultés rencontrées lors des précédentes expérimentations avec l'impression de nHA *in vivo*. Ainsi, nous avons utilisé un défaut de calvaria central qui a permis de positionner la souris plus facilement dans la station d'impression. Pour stabiliser les cellules imprimées sur le défaut, une membrane de PCL a été placée dans le défaut osseux comme support d'impression (Figure 82). Des cellules MG63-Luc et des souris Nude (n=5) ont été utilisées dans cette expérimentation. Les cellules ont été imprimées avec une concentration de 50 Millions/ml dans du milieu de culture IMDM supplémenté avec 0,5% d'alginate (w/v). Le motif était un cercle de 5 mm de diamètre avec une largeur de trait de 500 µm. Les paramètres laser étaient les suivants: Fréquence: 5 kHz; Puissance: 80 mW; Vitesse des scanners: 200 mm/s.

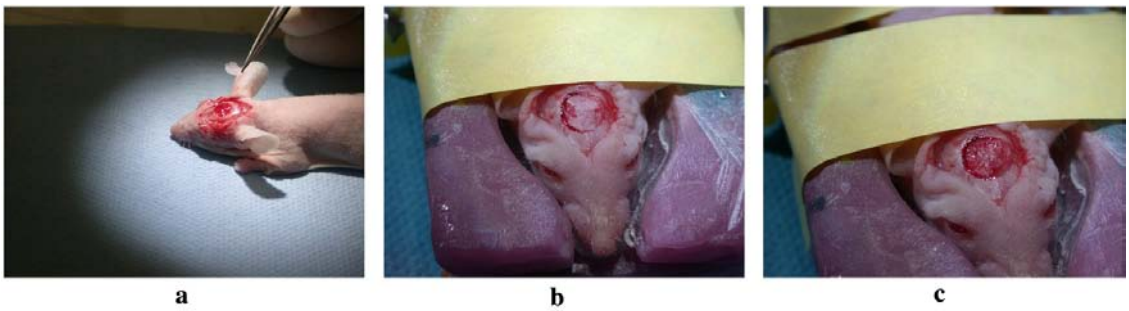


Figure 82: Impression de cellules MG63-Luc chez la souris Nude dans un défaut central de calvaria (a): mise en place de la membrane de PCL (b): Membrane de PCL dans le défaut osseux avant impression (c): Cercle de cellules imprimé sur la membrane de PCL

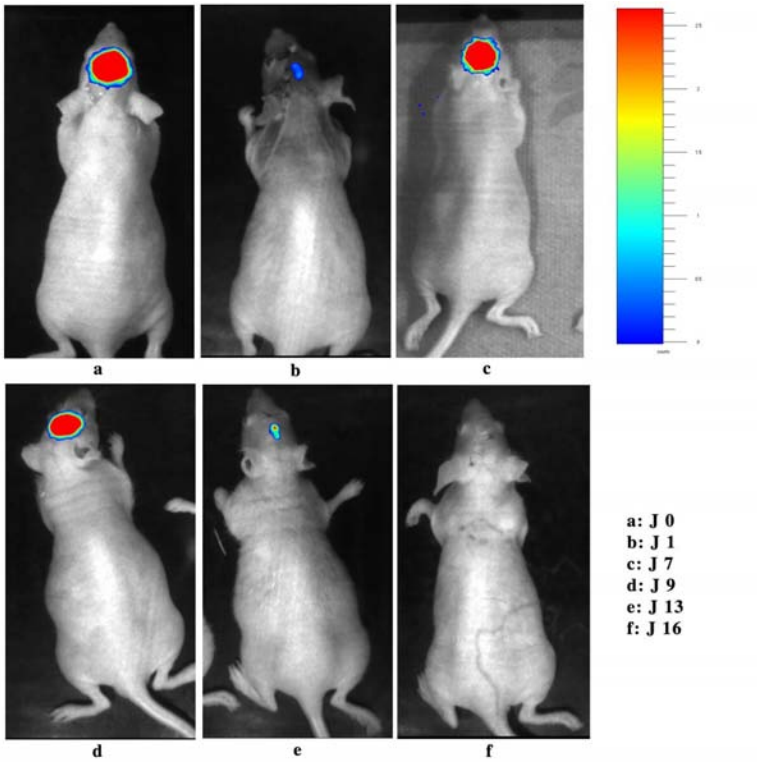


Figure 83: Observation de la luminescence sur une souris ayant reçu une impression de cellules MG63 dans un défaut osseux de calvaria (le seuillage utilisé sur les images est identique à tous les temps) (a-f: différents temps d'observation, entre 0 et 16 jours)

Les observations et la quantification de la luminescence au photon imageur ont montré chez une souris le maintien des cellules sur le site de l'impression et une prolifération pendant 15 jours. Après 15 jours, une décroissance rapide puis une disparition du signal ont été observées (Figure 83). Il faut noter sur cette figure que le signal diminue entre le jour de l'impression (J0) et le premier jour (J1), puis qu'il augmente à nouveau par la suite.
La quantification de la luminescence confirme ces données qualitatives (Figure 84).

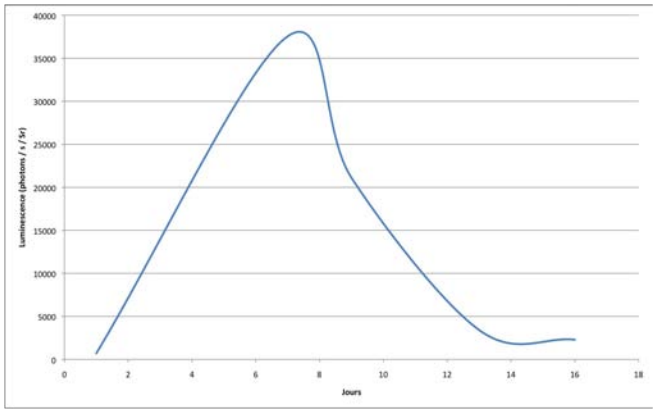


Figure 84: Quantification de la luminescence par photon-imageur après impression de cellules s MG63 dans un défaut osseux de calvaria

L'histologie décalcifiée sur la souris étudiée a montré une réparation partielle du défaut osseux par rapport à un animal qui n'avait pas reçu de matériau ni de cellules (Figure 85).

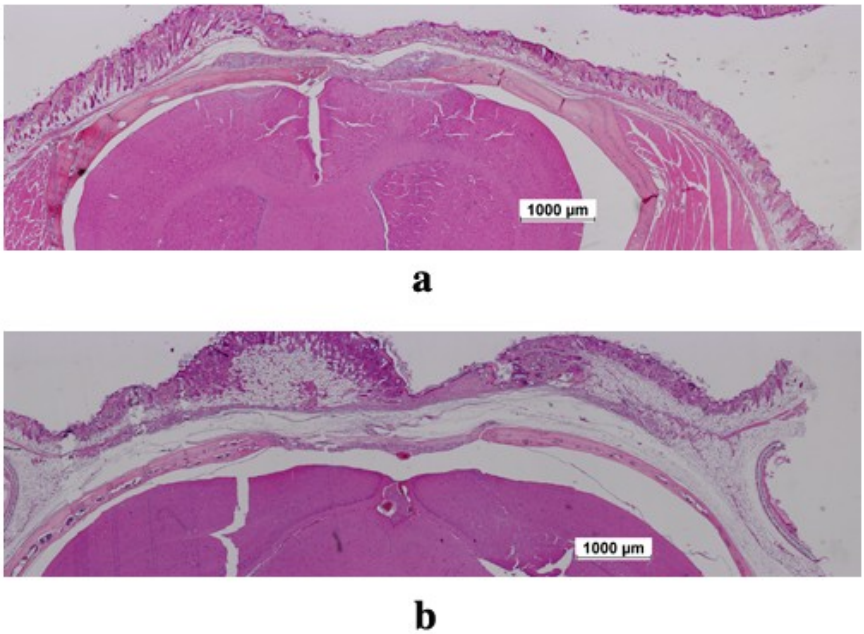


Figure 85: Histologie décalcifiée (Coloration HES) des calvarias de souris à 1 mois. Une réparation osseuse partielle est présente du coté test (a) tandis qu'aucune réparation osseuse n'est présente coté témoin (b). Les flèches représentent les limites internes des défauts osseux.

Les résultats n'ont pu être obtenus que chez un seul animal. En effet, une mortalité importante est survenue en per- et en post-opératoire en raison de complications hémorragiques. En effet, le défaut de calvaria central est situé à l'aplomb de la suture inter-pariétale et en rapport direct avec le sinus veineux sagittal supérieur, ce qui augmente le risque hémorragique par rapport aux défauts latéraux

DISCUSSION

Nous avons montré en introduction qu'une des limites actuelles de l'ingénierie tissulaire basée sur le « scaffold » est le manque de contrôle de l'organisation interne des tissus hybrides. En effet, il est difficile d'obtenir un ensemencement cellulaire homogène au sein des biomatériaux poreux, et la mise en place d'une vascularisation efficace dans ces biomatériaux est encore plus aléatoire. Les méthodes de prototypage rapide permettent actuellement de produire des scaffolds structurés et le bioprinting consiste à réaliser des micro-impressions d'éléments biologiques (cellules, hydrogels) avec une géométrie contrôlée dans l'espace, tout en préservant les propriétés des éléments imprimés. L'originalité de ces méthodes est d'une part l'impression couche par couche des matériaux et d'autre part le pilotage par informatique des impressions (156,86,118). Les applications potentielles du bioprinting sont la production de tissus artificiels pour la médecine régénératrice, et la mise au point de modèles d'étude pour des études fondamentales en biologie ou en pharmacologie (143).

Mironov a conceptualisé les trois étapes principales du bioprinting pour la fabrication d'organes (5): il s'agirait dans un premier temps de planifier la fabrication du tissu artificiel, ensuite de construire le tissu couche après couche et enfin de réaliser la maturation de l'organe avant son implantation. La planification (blue print) serait faite avec une interface informatique afin de modéliser l'organe en 3 dimensions et de choisir les encres (viscosité, densité cellulaire), leur mode d'assemblage et les paramètres d'impression (vitesse d'impression, réglage des têtes d'impression ou des lasers). L'impression proprement dite devrait se faire en conditions stériles, et l'automatisation des procédures permettrait d'obtenir des résultats rapides et reproductibles. Il serait alors nécessaire de travailler avec des vitesses élevées pour maintenir les cellules vivantes et préserver les propriétés biologiques des matériaux manipulés. Enfin la dernière étape de maturation tissulaire se déroulerait dans un bioréacteur, de la même façon que les produits d'ingénierie tissulaire conventionnels (3). Bien que cette succession d'étapes n'ait jamais été réalisée à ce jour, sa conceptualisation permet d'entrevoir que les principaux verrous technologiques du bioprinting sont le choix et la mise au point de l'imprimante et la préparation des « encres » d'éléments biologiques.

La micro-impression d'éléments biologiques est une évolution logique de la fabrication de scaffolds par prototypage rapide pour l'ingénierie tissulaire puisqu'elle se place à l'interface de nombreuses disciplines (biologie, informatique, science des matériaux, physique) (157) avec l'objectif général de produire des organes artificiels hybrides organisés. La spécificité du bioprinting réside dans la capacité de déposer des cellules de façon contrôlée dans les 3 dimensions de l'espace. En dehors de ces points particuliers, la composition des encres (biomatériaux, cellules, hydrogels), les méthodes de maturation (statiques, dynamiques, bioréacteurs) et la caractérisation des matériaux produits (physico-chimie, biologie *in vitro* et *in vivo*) sont directement inspirés de l'ingénierie tissulaire « classique ». La principale différence dans le concept de départ du bioprinting par rapport à l'ingénierie tissulaire basée sur le scaffold est d'organiser le tissu à partir de la cellule jusqu'à l'organe entier (*méthode “bottom-up »*). A l'inverse, l'approche classique de l'ingénierie tissulaire est “basée sur le scaffold“: le point de départ est un biomatériau poreux qui permet de donner la forme générale de l'organe, puis le coeur de ce biomatériau sera cellularisé dans un second temps avec des systèmes de bioréacteurs par exemple (*méthode “top-down“*) (Figure 86) (158).

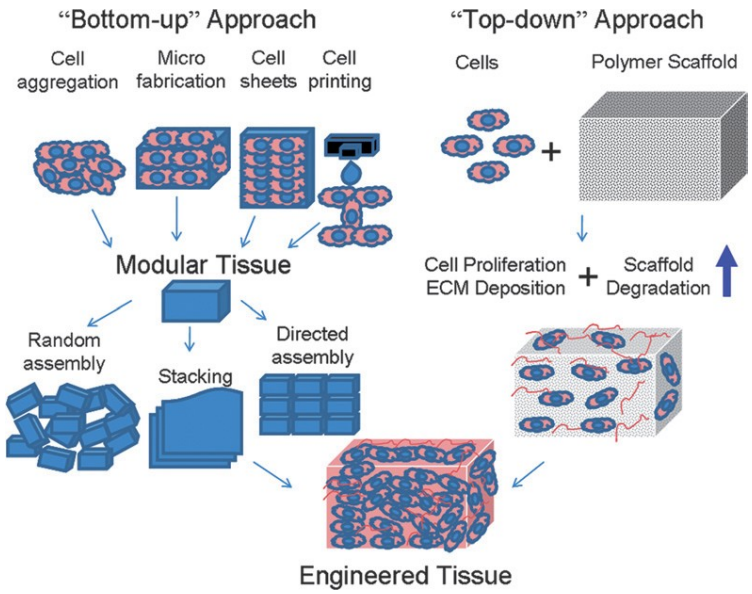


Figure 86: Les deux approches de l'ingénierie tissulaire; d'après (158)

L'objectif général de ce travail était donc d'évaluer quel pouvait être le bénéfice en terme de réparation tissulaire d'un matériau organisé dans les 3 dimensions de l'espace par rapport à un matériau non organisé mais comprenant les mêmes éléments. La discussion porte sur la préparation et l'impression de l'encre de nHA et de l'encre de cellules par LAB, sur la fabrication et l'implantation de matériaux composites tridimensionels PCL-Cellules, sur l'impression *in vivo* et *in situ* par LAB et sur la station de travail « LASIT » pour le LAB.

1. *Sur la préparation et l'impression de l'encre de nHA par LAB*

Dans l'approche traditionnelle d'ingénierie tissulaire osseuse, des biomatériaux à base de phosphate de calcium frittés poreux sont utilisés comme scaffolds, puis ils sont cellularisés *in vitro* avant d'être implantés. Cependant, cette approche ne permet pas de contrôler l'ensemencement cellulaire au sein du matériau. Dans le cadre de ce travail en ingénierie tissulaire osseuse, nous souhaitions imprimer des phosphates de calcium par LAB.
Dans l'approche de micro-impression d'éléments biologiques couche par couche, il faut préparer des encres imprimables contenant les matériaux d'intérêt. Concernant les phosphates de calcium, seule l'étude de Doraiswamy et coll rapporte des impressions par laser (MAPLE-DW) avec une poudre de zircone (particules de 0,3 à 3 µm) et avec une poudre d'hydroxyapatite (particules de 500 nm) mises en solution dans une solution de glycérol et d'eau (50% - 50% v/v) (139). Cette encre n'a pas été préparée spécifiquement pour le LAB et la taille importante des particules dans la poudre de départ explique la faible résolution d'impression obtenue (500 µm).

Comme les biomatériaux conventionnels de comblement osseux utilisés en ingénierie tissulaire (céramiques macro-poreuses) ne pouvaient pas être utilisés de façon satisfaisante pour le LAB, nous avons synthétisé une encre d'hydroxyapatite nano-cristalline. Cette encre a été préparée directement après la synthèse des cristaux, à partir de la solution finale, après ajustage du pH et maturation de la solution pendant 24h. Ensuite, du glycérol pouvait était ajouté à la solution afin d'augmenter la viscosité, mais le plus souvent, aucun additif n'était utilisé pour les impressions. L'apport de ce mode de préparation par rapport aux travaux antérieurs d'impression de phosphates de calcium par LAB (139) est le caractère nanométrique des particules en suspension qui autorisent l'étalement d'une couche fine d'encre sur le donneur. Nous avons vu précédemment que la finesse de la couche donneuse conditionne la résolution.
Dans notre travail, nous avons choisi de travailler avec une hydroxyapatite nano-cristalline car nous souhaitions obtenir des particules très fines afin de faciliter les impressions par LAB. Pour préparer cette encre, il fallait évaluer les propriétés physico-chimiques et les propriétés biologiques du matériau avant et après impression.

L'encre d'hydroxyapatite nano-cristalline a été préparée par précipitation humide, à partir d'une solution d'acide phosphorique et d'une solution d'hydroxyde de calcium. Cette méthode de synthèse présente l'avantage de ne pas utiliser de solvants et de ne produire que de l'eau comme produit de réaction complémentaire (154). Après la synthèse, nous avons mis en évidence les caractéristiques physico-chimiques de la nHA: les fonctions phosphates et hydroxyles ainsi que des fonctions carbonates ont été observées en Spectroscopie Infra Rouge (FTIR). L'analyse structurale par Diffraction X (DRX) a permis d'observer un spectre compatible avec des cristaux d'hydroxyapatite carbonatée. La présence de fonctions carbonates sur le cristal de nHA est probablement liée à la solubilisation du CO_2 ambiant pendant la synthèse. Cette carbonatation de l'hydroxyapatite est un phénomène couramment observé *in vivo*, en particulier dans le tissu osseux. Les observations MET ont montré des cristaux en forme de bâtonnets de 50 à 100 nm. La taille nanométrique des cristaux permet d'augmenter de façon importante la surface spécifique de la nHA par rapport à l'hydroxyapatite frittée, ce qui lui confère des propriétés biologiques intéressantes comme la résorbabilité (159) et la biocompatibilité (160).
La biocompatibilité du matériau a été évaluée *in vitro* sur des ostéoblastes de lignée MG63 cultivés en présence du matériau. Nous avons montré que la prolifération n'était pas affectée par le matériau et nous avons observé un contact étroit entre les cellules et la nHA par MEB.

Enfin, nous avons montré que ce matériau était ostéo-conducteur dans des défauts osseux critiques de calvaria chez la souris C57 Black après 3 mois de cicatrisation. Nous n'avons pas observé de réaction à corps étranger ni après 1 mois, ni après 3 mois (154).

La nHA a donc été imprimée par LAB avec plusieurs énergies, sous la forme de motifs structurés, avec une résolution de 60 µm environ. Nous avons montré que les propriétés physico-chimiques étaient globalement conservées après impression, quels que soient les paramètres laser utilisés (6 à 12µJ). La seule modification observée en FTIR et en DRX était une carbonatation du matériau après impression, qui pouvait être due à une interaction des cristaux de nHA avec le CO_2 ambiant (161).

La morphologie des gouttes variait en fonction de l'énergie laser: pour les conditions d'énergie les plus élevées (20 µJ), des phénomènes d'écrasement des éjecta sur le substrat avec des gouttes irrégulières et de petites gouttes satellites (splashing) étaient observés. Comme décrit précédemment (162), ce phénomène est du à l'énergie cinétique élevées des gouttes dans ces conditions et à leur interaction violente avec le substrat receveur.

Dans des études antérieures, la micro-impression de phosphates de calcium a été réalisées par laser (MAPLE-DW) (139,163) avec une résolution de 500 µm à 1 mm pour le diamètre des gouttes imprimées. Cette faible résolution est liée à la taille importante des particules de la poudre imprimée (500 nm) et à l'épaisseur de la couche d'encre étalée sur la lame donneuse (250 µm). Nous avons démontré qu'il était possible d'imprimer des gouttes d'un diamètre plus faible en utilisant des particules plus petites (50 à 100 nm) et une couche d'encre plus fine (20 à 30 µm) sur la lame donneuse (155).

Après impression de matrices de gouttes et de cercles de nHA, des cellules MG63 ont été ensemencées sur ces motifs, ce qui a permis la formation d'agrégats cellulaires organisés selon ces distributions. Ceci montre que la biocompatibilité de nHA n'a pas été altérée par l'impression par LAB. De façon plus générale, cela montre la capacité du LAB à générer des motifs pour favoriser l'organisation cellulaire via le dépôt de matériau. Enfin, nous avons illustré l'avantage d'utiliser une solution biocompatible, sans solvants ou réactifs toxiques à l'inverse des études sur le jet d'encre de phosphates de calcium (164,165).

Cette partie a donné lieu à une publication acceptée sur la synthèse et la caractérisation de nHA (154) et à une autre publication en cours de révision sur l'impression de nHA et de cellules (155).

2. *Sur la préparation et impression d'encres de cellules par LAB*

Comme détaillé précédemment, le bioprinting a pour objectif de fabriquer des matériaux cellularisés organisés dans les 3 dimensions de l'espace afin de répondre à certaines limites de l'ingénierie tissulaire. L'étape préliminaire de la fabrication de matériaux cellularisés avec la micro-impression d'éléments biologiques par LAB était de démontrer que la manipulation de ces cellules est possible, sans altération de la viabilité ni de la capacité de prolifération, ni du phénotype.

La préparation des encres de cellules a d'abord nécessité le choix d'un type cellulaire, puis la concentration cellulaire et la composition de la matrice de l'encre ont dû être ajustées. Après impression par LAB, la viabilité, le phénotype et la prolifération des cellules ont été évalués.

Dans ce travail, les cellules utilisées pour les impressions par LAB étaient issues de lignées (MG63 et Eahy926) ou bien de cultures primaires (HOP et ADSC).
Les MG63 ont déjà été utilisées dans des études précédentes par MAPLE-DW (119,134,135,139). Les cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaines (HBMSC) et les cellules mésenchymateuses issues de tissu adipeux humain (ADSC) ont été utilisées très récemment dans la littérature (120). Dans notre travail, les HBMSC ont été induites vers un phénotype ostéoblastique (HOP) avant impression. Des cellules primaires d'origine animale ont aussi été utilisées dans les études antérieures (brebis (98), porc (129)).
L'analyse de la littérature a montré que l'objectif des premières études était simplement de conserver la viabilité cellulaire après impression de cellules de lignée tandis que plus récemment, l'objectif a été d'étudier le maintien de la fonction des cellules ainsi que de leur capacité de différenciation (129). Dans les études antérieures, le montage expérimental était différent du nôtre pour le type de laser et la méthode d'impression. Il a donc fallu déterminer les conditions d'impression avec notre montage expérimental pour tous les types cellulaires utilisés.
Nous avons utilisé des concentrations cellulaires de 50 millions de cellules/ml le plus souvent. Cette concentration est plus élevée que la plupart des études antérieures d'impression assistée par laser, ce qui nous a permis d'imprimer de fortes densités de cellules dans chaque goutte (Figure 36, page 72) et des alignements cellulaires continus (166). Au niveau de la résolution, nous avons imprimé des gouttes de 180 µm de diamètre contenant chacune environ 50 cellules (Figure 36, Page 72). Des lignes de cellules jointives ont également été imprimées avec des encres cellulaires fortement concentrées à 100 millions de cellules/ml (166). Cette densité est supérieure aux études antérieures qui ont imprimé des amas cellulaires d'une centaine de microns avec une dizaine de cellules par goutte (119). De plus, la densité cellulaire utilisée est nettement supérieure à celle utilisée par les imprimantes à jet d'encre (102,104).
Le LAB permet donc d'imprimer une large gamme de densités cellulaires, mais le principal intérêt de cette méthode est l'impression de fortes concentrations cellulaires très localisées (niches cellulaires). L'intérêt de la mise en place de ces “niches“ composées de cellules souches pourrait être de placer des groupes de cellules dans un environnement favorable à leur prolifération et à leur différenciation (167). De cette façon il serait autant, voire plus efficace, de placer des groupes de cellules dans des zones très précises du néo-tissu plutôt que de réaliser un ensemencement homogène du matériau.

Mais nous avons également montré qu'il était possible d'imprimer moins de cellules dans des

gouttes plus petites en diminuant l'intensité de l'énergie laser utilisée (Figure 37, Page 73).
La matrice des encres de cellules était composée du milieu de culture correspondant (IMDM pour les HOP, Eahy926 et MG63 et DMEM-F12 pour les ADSC). Pour augmenter la viscosité de l'encre, nous avons ajouté du glycérol ou bien de l'alginate de sodium dans la solution. Le glycérol a été rapidement abandonné en raison de son effet toxique sur les cellules lorsqu'il était utilisé à des concentrations supérieures à 2,5 % (v/v). L'alginate est un matériau biocompatible, largement utilisé en ingénierie tissulaire et nous l'avons utilisé avec des concentrations de 0,5 à 1% (w/v). L'augmentation de la viscosité permet de ralentir la vitesse d'éjection des gouttes d'encre, ce qui semble avoir un effet positif sur le maintien de la viabilité cellulaire. D'autres hydrogels ont également été utilisés pour modifier la viscosité de l'encre (méthyl-cellulose (142), gélatine (144)). De nombreux hydrogels visqueux et biocompatibles peuvent donc être utilisés afin de modifier les propriétés rhéologiques des encres de cellules.

Concernant la viabilité cellulaire après impression par LAB, l'analyse de la littérature a montré que des types cellulaires variés pouvaient être imprimés avec succès dans des systèmes utilisant plusieurs montages expérimentaux, avec des lasers UV ou des lasers IR (Tableau 4, Page 41). Le test au Live/Dead a été largement utilisé dans la littérature pour caractériser la viabilité des cellules après impression par laser (119) et nous l'avons également utilisé dans ce travail. Ce test est rapide et simple à réaliser et donne un résultat immédiat. Cependant, il ne permet pas d'obtenir des données quantitatives sur le taux exact des cellules vivantes ou mortes et il ne permet pas non plus de connaître les causes de la mort cellulaire. Ainsi, des études quantitatives évaluant la viabilité cellulaire sont nécessaires afin d'identifier précisément les effets de chaque paramètre impliqué dans le maintien de la viabilité. Bien que le maintien de la viabilité cellulaire après impression par LAB ne soit plus un problème aujourd'hui, nous avons observé que la viabilité cellulaire pouvait être affectée dans certaines conditions expérimentales. Ainsi, nous avons confirmé les résultats de Ringeisen (131) qui a montré que la viabilité pouvait être affectée lors de l'utilisation d'énergies laser trop élevées. Ceci a été réalisé sur des cellules Eahy926, qui ont été choisies car elles semblaient particulièrement sensibles à l'impression par LAB (Figure 38, Page 73). Nous avons également confirmé que l'augmentation de l'épaisseur de la couche de Matrigel® sur la lame receveuse pouvait limiter la mortalité cellulaire dans le cas des énergies les plus fortes. Par ailleurs, nous avons montré que l'augmentation de la viscosité de l'encre par augmentation de la concentration de l'encre en alginate de 0,5% à 1% (v/v), permettait de limiter la mortalité cellulaire observée dans le cas des énergies laser importantes et des couches de Matrigel® plus minces Figure 39, Page 73). Cette diminution de la mortalité est probablement liée à la diminution de la vitesse d'éjection observée lorsque des solutions plus visqueuses sont utilisées (168). Nous avons aussi démontré que l'épaisseur de la couche de Matrigel® pouvait être diminuée tout en conservant une viabilité cellulaire importante si la viscosité de l'encre était augmentée et l'énergie laser diminuée (168).
Les perspectives à ce niveau pourraient être d'évaluer les causes exactes de la mort cellulaire observée dans certaines conditions d'impression. Des observations en MET de cellules mortes imprimées dans des conditions spécifiques pourrait nous renseigner sur l'état des différents composants de ces cellules. Il pourrait s'agir d'évaluer l'intégrité de la membrane cellulaire et de la membrane nucléaire après impression grâce à des colorations spécifiques (Calcéine et Hoechst, respectivement). Par ailleurs, le rôle du cytosquelette dans l'absorption des contraintes subies au moment de l'atterrissage pourrait être évalué, en traitant par exemple les cellules à la cytochalasine D.

Après l'évaluation des effets du LAB sur la viabilité cellulaire, nous avons montré que l'impression par LAB ne modifiait pas les capacités de prolifération cellulaire. Ceci a été

montré *in vitro* sur des cellules mésenchymateuses humaines dérivées de moelle osseuse et induites vers un phénotype ostéoblastique grâce à un suivi des cellules imprimées pendant 15 jours (Figure 36, Page 72) (155). Ensuite, nous avons montré que des cellules MG63 imprimées sur des membranes de PCL puis implantées *in vivo* dans des défauts osseux chez la souris NOG, avaient conservé leurs capacités de prolifération pendant les 2 mois de l'étude (Figure 65, Figure 66, Page90).
Enfin, le phénotype ostéoblastique des cellules HOP n'a pas été modifié par l'impression car elles exprimaient la phosphatase alcaline (PAL) et l'ostéocalcine (OCN) 15 jours après impression (Figure 36, Page 72). La PAL est un marqueur ostéoblastique précoce et l'OCN est un marqueur de différenciation plus tardif.
Un travail récent de Grüene et coll a évalué le maintien des capacités de différenciation de cellules primaires mésenchymateuses issues de moelle osseuse de porc après impression par LAB, avec un montage expérimental très proche du nôtre (129). Après impression, les cellules ont été cultivées en présence de milieux inducteurs vers la lignée ostéoblastique ou la lignée chondrogénique. Après 21 jours de culture, les marqueurs spécifiques de ces lignées (ostéoblastique et chondrogénique) ont été mis en évidence, ce qui prouve que les cellules se sont différenciées après impression. Toutes ces études vont dans le sens d'une innocuité du LAB pour la micro-manipulation des cellules. Les perspectives à ce niveau pourraient être d'induire la différenciation de cellules souches grâce à des facteurs du micro-environnement cellulaire. Il pourrait s'agir de facteurs chimiques imprimés à proximité des cellules de façon à guider leur différenciation (169). Par ailleurs, la modification des propriétés mécaniques de la matrice extra-cellulaire peut également permettre la différenciation cellulaire (170). Des expériences préliminaires menées au laboratoire semblent montrer que des gradients de rigidité dans des hydrogels de collagène peuvent être réalisés par LAB, ce qui pourrait permettre d'induire la différenciation de cellules mésenchymateuses imprimées au niveau de ces gradients.

Concernant le revêtement de la lame receveuse, Barron et coll ont les premiers montré l'intérêt d'une couche de Matrigel® de 50 µm à 100 µm sur la lame receveuse pour amortir les chocs dus à l'impression (119) avec des lignées cellulaires. Par la suite, plusieurs matériaux ont été utilisés dans la littérature. Il s'agit essentiellement du Matrigel® qui est utilisé le plus souvent avec une épaisseur de 100 µm. Comme mentionné précédemment, l'épaisseur de cette couche a un effet critique sur la viabilité des cellules imprimées et soit être disposée en fonction de l'énergie et de la viscosité.

Le Matrigel est utilisé comme matrice extracellulaire pour la culture de cellules. Cet hydrogel est dérivé d'un sarcome et il est utilisé pour apporter un environnement tridimensionnel favorable pour explorer la morphologie, la production de protéines et l'expression génique des cellules en culture. La composition du Matrigel inclut des composants de la matrice extra-cellulaire (collagène IV, des héparanes sulfates, des protéoglycanes) et des facteurs de croissance (TGF-ß, EGF, IGF-1, BFGF, PDGF) (137). La composition complète du Matrigel® n'est pas connue et récemment des auteurs ont proposé de le substituer par la gélatine pour le LAB afin de mieux contrôler le micro-environnement des cellules imprimées (144). Des expériences sont en cours au laboratoire avec du collagène de type 1.

Dans ce travail, nous avons montré qu'une couche de nHA imprimée pouvait jouer le même rôle que le Matrigel® sur la lame receveuse(Figure 46 , Page 79). La nHA a été utilisée lors de la même séquence d'impression que les cellules HOP et elle a permis de maintenir la viabilité et la prolifération cellulaires après impression (Figure 46, Page 79). Comme la nHA était imprimée en solution, il est probable que celle-ci ait joué le rôle d'amortisseur.

Nous avons également démontré que des membranes de PCL imprégnées de Matrigel® pouvaient également être utilisées comme support d'impression *in vitro* (Figure 56, Page 83) ou *in vivo* (Figure 65 et Figure 83, Pages 90 et 101). Une publication antérieure a rapporté l'impression de cellules par laser sur un biomatériau macroporeux fabriqué par prototypage rapide (98), mais dans cette étude, la viabilité cellulaire n'a pas été réellement démontrée après impression.
Le revêtement de la lame receveuse est indispensable lors de la réalisation d'impressions de cellules pour plusieurs raisons: Tout d'abord, la présence de l'hydrogel ou de membranes de PCL permet de maintenir les cellules imprimées en place avant qu'elle ne puissent s'attacher à leur substrat. En effet, comme nous l'avons montré grâce à des observations en microscopie confocale et en microscopie optique conventionnelle, les cellules vont s'enchâsser dans l'hydrogel, ce qui va les bloquer sur place et éviter leur mobilisation par lavage lors du dépôt du milieu de culture (Figure 43 et Figure 44, Page 75). Ensuite, la couche d'hydrogel ou la membrane de PCL permettent d'absorber les chocs induits lors de l'atterrissage des cellules sur leur substrat. En effet, Wang et coll. ont montré par modélisation que l'interaction des cellules imprimées avec l'hydrogel était suivies d'un premier choc à l'interface air- hydrogel et éventuellement d'un deuxième choc à l'interface hydrogel-verre. Ainsi, l'augmentation de l'épaisseur de l'hydrogel permet de s'affranchir du 2e choc car les cellules sont freinées par l'hydrogel et restent incluses dans celui-ci (Figure 87) (171). De plus, il a été démontré que la profondeur de pénétration cellules dans Matrigel® est fonction de la fluence (137). Nous avons montré que l'effet négatif sur la viabilité d'une énergie excessive pouvait être compensé par une épaisseur de Matrigel plus importante. Ainsi, il semble que la mort cellulaire observée dans certaines conditions soit plutôt liée à l'atterrissage qu'à l'éjection des cellules (168).

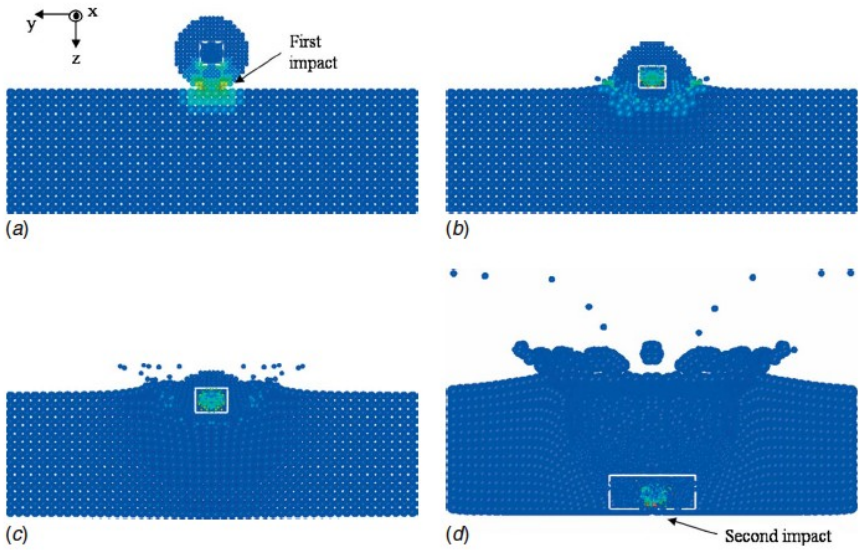


Figure 87: Modélisation numérique des deux impacts subis par les cellules lors de l'aterrissage sur un substrat recouvert d'un hydrogel. (a) premier impact lors de la transition entre air et hydrogel; (b,c): traversées de l'hydrogel par la cellule; (d):second impact à l'interface hydrogel-verre; d'après (171)

Cette partie a donné lieu à deux publications en cours de révision (155,168) sur l'impression de cellules HOP et EaHy926. Les paramètres permettant de maintenir la viabilité, la prolifération et le phénotype cellulaire ont été déterminés. Par ailleurs, nous avons participé à une revue de littérature sur l'impression de cellules par LAB (172). et à un article montrant la résolution des impressions de cellules par LAB (173).

3. *Sur la fabrication et l'implantation de matériaux tridimensionnels PCL-Cellules*

L'objectif de cette expérience était d'évaluer l'influence de l'organisation tridimensionnelle d'un matériau cellularisé sur la prolifération cellulaire et la néo-formation osseuse. Nous avons utilisé des membranes de PCL tissées par “electrospinning“ et une encre de cellules imprimée par LAB dans les mêmes proportions pour les deux conditions étudiées. Le matériau a été organisé soit “couche par couche“ avec une couche de cellules imprimées sur chacune des trois membranes de PCL superposées (Test), soit avec trois couches de cellules superposées sur la partie supérieure de trois membranes de PCL superposées (Témoin) (Figure 64, Page 90). Nous avons donc utilisé la même quantité de cellules et de membranes de PCL dans les deux situations. La principale conclusion de cette étude est que nous avons démontré dans ce modèle qu'un ensemencement cellulaire couche par couche était plus favorable à la prolifération cellulaire que l'ensemencement à la surface du même matériau.

L'étape préliminaire consistait à choisir un type cellulaire qui persiste et qui prolifère chez la souris NOG. Les souris NOG sont immuno-déficientes car elles ne produisent pas de lymphocytes du fait d'une anomalie histologique du thymus et de la rate (174). Nous avons donc évalué la prolifération des MG63 et des ADSC en sous cutané chez la souris NOG grâce à un modèle de tumeurs utilisé couramment dans des études de tumorigénèse *in vivo* (175). Nous avons finalement décidé d'utiliser les cellules MG63-Luc pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elles ont proliféré davantage que les ADSC-Luc au cours de l'expérience et même les plus faibles quantités de cellules implantées ont donné lieu à des tumeurs alors que les ADSC n'étaient plus détectées après 1 mois pour les plus petites quantités implantées. Ensuite, nous avons observé sur les coupes histologiques une néo-formation osseuse au sein des tumeurs de MG63, alors que nous n'avons pas observé de tissu osseux sur les coupes de tumeurs d'ADSC (Figure 62 et Figure 63, Page 86).

Les observations *in vitro* ont montré que les cellules MG63 imprimées sur PCL étaient viables après 4 jours de culture et qu'elles étaient étalées sur les fibres de PCL, ce qui confirme la biocompatibilité de ce matériau. Cependant, une étude quantitative *in vitro* sera nécessaire afin de confirmer les résultats quantitatifs de l'étude *in vivo*. Après préparation *in vitro* des matériaux cellularisés, ceux-ci ont été maintenus à l'incubateur pendant 24 h pour permettre l'attachement des cellules sur le PCL. Ils ont ensuite été implantés *in vivo* dans des défauts de calvaria. Chaque animal était son propre témoin car il a reçu un matériau Test (droite) et un matériau Témoin (gauche). Tous les animaux ont survécu à la chirurgie et le suivi après implantation a été fait par photon imageur, les tissus ont été observés après sacrifice au micro-scanner et en histologie décalcifiée. Les résultats *in vivo* ont montré que l'organisation “couche par couche“ était plus favorable à la prolifération cellulaire à la fois sur la quantification en photon imageur , mais aussi sur les coupes histologiques. En effet, la quantification en photon imageur du coté Test a montré des résultats significativement plus élevés que du coté témoin à tous les temps du suivi. L'histologie a montré la présence d'un tissu fibreux plus épais du coté Test que du coté Témoin, et des ébauches de tissu osseux ont été observées coté témoin. Cette prolifération cellulaire peut s'expliquer de deux façons: d'une part il est probable que la construction “couche par couche“ soit plus favorable à la prolifération cellulaire car les cellules étaient placées dans un environnement tridimensionnel, mais il est également possible que les cellules soient maintenues au contact du PCL plus efficacement lorsque les couches sont superposées, ce qui évite leur migration au moment de l'implantation ou au cours de la cicatrisation. En effet, on peut penser que les cellules

imprimées sur les 3 couches de PCL superposées ne soient pas restées en place lors de l'implantation, ce qui explique la différence de prolifération par la suite. Dans tous les cas, cet ensemencement en multicouches semble réellement avoir un effet bénéfique sur la prolifération cellulaire. Nous avons donc mis au point un modèle de culture tridimensionnel utilisant un “module élémentaire = building blocks“ (Figure 86, Page 106), (5,158) fait de membranes fines comme support à l'impression et des cellules imprimées par LAB. Ce module a été superposé en couches successives, ce qui a permis de stabiliser la structure en 3D, et d'apporter un environnement favorable à la prolifération cellulaire, tout en limitant la migration des cellules en dehors du matériau après implantation. Ce modèle pourrait être utilisé pour étudier des combinaisons d'autres matériaux et d'autre types cellulaires, en incluant éventuellement des facteurs de croissance.

Nous avons utilisé des membranes tissées par “electrospinning“ qui sont à la fois très fines, très poreuses et qui possèdent également des propriétés mécaniques suffisantes pour permettre leur manipulation pour les implantations *in vivo*. Les membranes composées de PCL ont supporté la prolifération cellulaire, mais elles n'ont pas induit de néo-formation osseuse. Une perspective à ce niveau pourrait être d'utiliser des membranes fabriquées selon la même méthode mais avec un matériau induisant la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses (MSC) en ostéoblastes. Ainsi, les membranes de PEOT/PBT tissées par electrospinning ont permis la différenciation de MSC *in vitro* vers un phénotype ostéoblastique (93). L'ajout de particules de nHA au polymères de PEOT/PBT semble renforcer cet effet (94). Des membranes de gélatine incluant des particules de nHA ont également été proposées pour la régénération osseuse (176). Il pourrait également être intéressant d'utiliser des membranes de collagène (177) ou de collagène-hydroxyapatite (176) qui sont fortement ostéo-conductrices et qui peuvent être ostéo-inductrices dans certaines conditions.

Dans cette étude, nous avons utilisé des cellules MG63 car l'objectif principal était d'étudier l'influence de l'architecture interne du matériau sur la prolifération cellulaire. Nous avons donc choisi des cellules dont la prolifération cellulaire était certaine chez la souris NOG, comme démontré précédemment dans l'étude préliminaire d'implantation sous cutanée (voir plus haut). Les MG63 sont traditionnellement utilisés simplement dans des cultures *in vitro* mais nous les avons utilisées dans ce travail dans un modèle de culture tridimensionnel *in vivo* chez la souris (Page 101). Les cellules de lignée présentent l'avantage d'être obtenues rapidement en grande quantité et ce sont des groupes cellulaires homogènes. Cependant, comme ces cellules sont cancéreuses, elles ne peuvent être utilisées que pour des études préliminaires. Ainsi, les résultats obtenus avec des cellules de lignée devront être validés dans un second temps avec des cellules primaires. Par ailleurs, la multi-potence des cellules mésenchymateuses présente un grand intérêt en ingénierie tissulaire car elle peut conduire à l'obtention de plusieurs types cellulaires, soit en utilisant des facteurs de différenciation solubles (169), soit en modifiant les propriétés mécaniques du micro-environnement (170). Le suivi des cellules par la bio-luminescence a présenté un intérêt certain dans cette étude puisque cette méthode a permis de localiser précisément les cellules implantées et de quantifier leur prolifération dans le temps.

Dans cette expérience *in vivo*, nous avons imprimé les cellules par LAB tout en conservant la viabilité et les capacités de prolifération des MG63. Le maintien de la viabilité de ces cellules après impression par MAPLE-DW a déjà été démontré, mais les impressions sur PCL n'ont jamais été réalisées. Nous avons montré *in vitro* qu'il était possible d'organiser les cellules sur une membrane de PCL (Figure 56 et Figure 57, Page83) mais l'impression des cellules pour les matériaux implantés *in vivo* a été faite de façon homogène, sous forme de matrices de gouttes, afin d'imprimer le maximum de cellules. Les études futures avec ce modèle devraient permettre de réaliser des structures plus complexes par LAB, en associant plusieurs encres de cellules et des biomatériaux (nHA). Des facteurs de croissance pourront également être

organisés sur des membranes afin d'orienter la prolifération cellulaire, de la même façon que Cooper et coll qui ont dirigé la néoformation osseuse dans des calvarias de souris, grâce à l'impression de BMP-2 par jet d'encre sur des membranes d'allogreffes de derme d'origine humaine (112).
Les ADSC ont été imprimées *in vitro* sur les membranes de PCL, avec un maintien de la viabilité et du phénotype (Figure 58, Page 83). Ces cellules devraient être utilisées dans les prochaines études utilisant ce modèle.

Après 2 mois de cicatrisation, les observations en micro-scanner n'ont pas montré de néo-formation osseuse, ni du coté test, ni du coté témoin. Ainsi, les cellules MG63 n'ont pas induit de minéralisation malgré la prolifération importante observée. Il faudra utiliser des ostéoblastes ayant des capacités de minéralisation supérieures ou bien des facteurs de croissance comme les BMP afin d'obtenir de l'os. Pour les quantifications de la néoformation osseuse sur les images de micro scanner, nous avons choisi d'utiliser un volume cylindrique standardisé. En effet, tous les défauts initiaux avaient un diamètre de 5 mm environ, de même que les membranes de PCL. Le volume de la région d'intérêt (ROI) a été construit sous forme d'un cylindre de 3 mm de diamètre et de 60 coupes (14 µm x 60 = 840 µm) d'épaisseur. Nous avons donc sous dimensionné le diamètre de la zone d'intérêt pour être certains de ne pas empiéter sur la zone d'os non éliminée au départ. L'épaisseur a été sur-dimensionnée par rapport à l'épaisseur habituelle de la calvaria de souris (500 µm) afin de prendre en compte l'épaisseur des membranes de PCL qui pouvaient parfois dépasser du défaut osseux. Une autre approche de quantification aurait pu être de considérer le défect osseux dans son ensemble afin de prendre en compte l'intégralité de la surface osseuse dans les quantifications. Cependant, les bords du défaut peuvent parfois avoir une morphologie différente lors de la chirurgie du fait des conditions de réalisation: la surface de la calvaria est convexe et des débris osseux peuvent persister après l'exérèse de la calotte osseuse. Il est donc apparu qu'il était plus réaliste de ne pas considérer les bords du défect dans la quantification. Dans tous les cas, le micro-scanner n'a pas révélé de néo-formation osseuse et la valeur du BV/TV était similaire entre les deux cotés et significativement inférieure aux valeurs d'un animal témoin non opéré.
Une seule publication antérieure a rapporté l'impression de cellules par laser sur un biomatériau macroporeux fabriqué par polymérisation multi-photonique (98), mais dans cette étude, la viabilité cellulaire n'a pas été réellement démontrée après impression. Par ailleurs, cette méthode ne permettait pas réellement d'organiser le matériau en couches, contrairement à notre modèle d'impression séquentielle sur membranes de PCL.

Cette partie va donner lieu à une publication qui est en cours de rédaction.

4. *Sur l'impression in vivo et in situ par LAB*

Nous avons montré précédemment que la fabrication de matériaux cellularisés couche par couche permettait de placer les cellules au sein du tissu reconstruit et que cette configuration favorisait la prolifération cellulaire. Le rôle de la maturation *in vitro* des produits d'ingénierie tissulaire est de favoriser la colonisation des cellules au sein du scaffold dans des conditions statiques ou dynamiques (3). La fabrication de produits d'ingénierie tissulaire par bioprinting permet de placer les cellules au sein du matériau, donc il est possible que l'étape de maturation *in vitro* ne soit pas nécessaire ou qu'une maturation plus courte soit suffisante. Dans ce cas, le but serait simplement de permettre l'attachement des cellules sur la matrice extra-cellulaire imprimée de façon concomitante. Le but de cette étude était d'évaluer si l'impression de matériaux et de cellules était techniquement possible *in vivo* et si cette modalité permettait de maintenir les propriétés des éléments imprimés. De façon générale, la micro-impression d'éléments biologiques *in vivo* et *in situ* pourrait trouver des applications dans la chirurgie robotisée (178). Le principal résultat est que nous avons prouvé que ce concept était applicable *in vivo* chez la souris dans le modèle de défaut osseux critique sur la calvaria.

Le défaut osseux critique sur la calvaria de souris a été choisi pour plusieurs raisons: Tout d'abord l'accès chirurgical est facile, le défaut est réalisable dans des conditions reproductibles et le résultat peut être contrôlé immédiatement. Pour les impressions *in vivo* et *in situ*, il fallait un défaut relativement plan, afin de faire la focalisation sur la zone d'impression; de plus il fallait pouvoir placer la surface osseuse parallèlement à la lame donneuse. La position du défaut de calvaria permet de répondre à ces deux nécessités. La finesse des tissus mous recouvrant la zone d'intérêt nous a permis de suivre la prolifération cellulaire au photon imageur dans de bonnes conditions, avec une atténuation minime du signal par les tissus mous. En effet, dans le cas d'implantation de cellules luminescentes dans des organes internes, il est parfois difficile de localiser le signal et celui-ci peut être très atténué. Enfin, les coupes histologiques et les observations en micro-scanner permettent de visualiser les deux conditions (droite et gauche) dans le même champ, ce qui facilite la comparaison du Test et du Témoin. L'absence de contraintes mécaniques appliquées à la calvaria est un avantage certain pour le bioprinting puisque les matériaux fabriqués ont des propriétés mécaniques très faible sau moment de la fabrication. Cependant, l'absence de contraintes appliquées peut aussi être considérée comme un inconvénient dans l'évaluation de matériaux de reconstruction osseuse. Lorsque nous aurons réussi à obtenir un tissu osseux fonctionnel dans ce site, il faudra utiliser un site subissant des contraintes mécaniques comme le condyle fémoral. Enfin, la calvaria est un os plat et très fin (400 à 500 µm) qui contient relativement peu de cellules et de moelle osseuse, ce qui n'est pas la situation la plus favorable pour la régénération osseuse.
Dans les perspectives, il pourra être intéressant d'utiliser des défauts osseux sur le condyle fémoral, mais le placement de l'animal dans la machine sera peut être plus complexe. Un modèle de défaut de cartilage sur un fémur bovin a également été utilisé pour des impressions *in situ* ex vivo. Les auteurs ont utilisé un hydrogel d'alginate et un hydrogel d'os bovin déminéralisé imprimé avec un extrudeur commercial (Fab@home) pour remplir le défaut cartilagineux ostéo-cartilagineux. L'appareillage utilisé est peu coûteux, basé sur un logiciel libre et il a permis dans ce cas de traiter la lésion à partir d'images du défaut réalisées par scanner (“Reverse Engineering“). Une autre équipe a réalisé des impressions de cellules humaines (fibroblastes et kératinocytes) *in vivo* et *in situ* sur la peau de souris nude (179). Ces auteurs ont montré que la cicatrisation était plus rapide du coté où des cellules ont été imprimées et l'histologie a montré que la peau néo-formée avait une structure normale.

Pour réaliser les impressions *in vivo* et *in situ* par LAB, nous avons dû remplacer la lame receveuse par la souris. Un portoir spécifique placé sur la platine receveuse a été réalisé, ce qui a permis de placer le défect osseux en face du trajet du laser. Cependant, il n'était pas possible de mobiliser la souris sur son axe et l'amplitude des déplacements était limitée en x, y ou z, ce qui a parfois compliqué les impressions *in vivo*. Pour poursuivre ces expériences d'impression *in vivo*, il sera donc nécessaire de modifier le portoir pour permettre une plus grande amplitude de déplacement, et une rotation des animaux sur l'axe sagittal et l'axe transversal.

L'étude préliminaire a consisté à évaluer l'effet du laser utilisé (1064 nm) sur les tissus environnants à la zone d'impression. La laser a été focalisé sur la dure-mère et une irradiation utilisant les mêmes paramètres que pour l'impression a été utilisée. Le suivi par IRM a révélé une inflammation sur la zone irradiée qui a régressé après une semaine et l'histologie n'a pas montré d'altération des tissus nerveux sous jacents. Le laser utilisé pour les impressions par LAB n'a donc pas entraîné de lésions irréversibles sur les tissus adjacents au défect osseux. De plus, le laser a probablement moins d'effets biologiques lors des impressions par LAB car les impulsions sont absorbées par la couche d'or sur la lame donneuse et une part infime de l'énergie laser est déposée sur les tissus receveurs.

Dans la première expérience d'impressions *in vivo*, nous avons utilisé une encre de nHA imprimée dans des défauts osseux de calvaria sur des souris OF-1. Les résultats de l'histologie des souris sacrifiées après une semaine ont montré que le matériau avait bien été imprimé dans le défaut osseux au contact de la dure mère. Cependant, il est apparu que le matériau était également présent du coté témoin négatif, à distance de la dure mère. La première conclusion est donc que le matériau a migré du coté controlatéral après impression du fait de son manque de cohésion et de l'absence de fixation aux tissus sous jacents. Par ailleurs, les expériences *in vitro* d'impression de couches superposées de nHA ont montré que le matériau était fortement compacté après impression, sans porosités, ce qui n'est pas favorable à la colonisation cellulaire et vasculaire nécessaire à a néo formation osseuse. Les observations après 1 mois ou 3 mois de cicatrisation ont montré une réparation osseuse inconstante, qui est en rapport direct avec ce manque de cohésion du matériau. La principale conclusion de cette expérience est que nous avons fait la preuve du concept d'impression *in vivo* en montrant sa faisabilité dans le défaut osseux de calvaria de souris. Dans les perspectives, il faudra envisager soit une stabilisation de cette encre de nHA avec des membranes résorbables ou bien il faudra modifier l'encre nHA afin de permettre sa gélification sur le site après impression.

La seconde expérience a consisté à imprimer une encre de cellules MG63-Luc sur des souris immuno-déficientes (Nude) en tenant compte des difficultés rencontrées lors des premières expériences. Tout d'abord, un défaut osseux central a été utilisé afin d'aligner le site d'impression au trajet optique du laser, ce qui a permis de limiter les déplacements du portoir receveur. Ensuite, nous avons utilisé une membrane de PCL comme substrat d'impression afin de maintenir les cellules imprimées en place. Concernant le défaut osseux central, sa situation à proximité du sinus veineux sagittal supérieur a provoqué des hémorragies chez plusieurs animaux qui n'ont pas survécu à l'intervention. Ce défaut osseux central sur la calvaria de souris a déjà été utilisé par d'autres équipes avec succès (112). Il pourrait donc être intéressant de reproduire ce type de défaut car la zone d'impression est plane et centrale, ce qui facilite la procédure d'impression *in vivo*.
Plus généralement, il reste à évaluer si la construction de matériaux couche par couche *in vivo* apporte un avantage par rapport à l'impression *in vitro* implantée immédiatement après impression. Il est probable que dans le cas de matériaux possédant peu de propriétés

mécaniques (hydrogels), la manipulation de matériaux créés *in vitro* altère leur structure. Dans ce cas l'impression *in vivo* présenterait un avantage certain. A l'inverse, dans le cas où les matériaux sont résistants mécaniquement, la réalisation *in vitro* est techniquement plus simple car il ne sera pas nécessaire d'installer l'animal sous l'imprimante.

Cette partie a débouché sur un brevet en cours d'expertise et à une publication acceptée (180).

5. *Sur la station de travail « LASIT » pour le LAB*

Concernant le choix de l'imprimante, les méthodes basées sur le jet d'encre permettent d'imprimer les hydrogels avec des volumes importants mais la densité de cellules imprimées par jet d'encre (5 Millions de cellules /ml) est très inférieure aux méthodes basées sur le laser (50 à 100 millions de cellules / ml). A l'inverse, les volumes imprimés par laser sont plus faibles (de l'ordre de 10 pl) mais la résolution et la densité cellulaires peuvent être beaucoup plus importantes (173). Enfin, les méthodes basées sur l'assemblage d'agrégats cellulaires ou l'extrusion d'hydrogels ont permis l'obtention des structures les plus volumineuses jusqu'à aujourd'hui par bioprinting, mais la résolution de ces méthodes reste relativement faible (500 µm) (114). Le choix de l'imprimante est donc étroitement lié à l'objectif recherché.

Dans ce travail, nous avons utilisé le prototype de micro-impression d'éléments biologiques assisté par laser développé au laboratoire. Celui-ci présentait plusieurs particularités par rapport aux montages expérimentaux pour le LAB décrits dans la littérature, notamment au niveau du type de laser utilisé et du système de guidage par informatique.
Dans la plupart des études antérieures la longueur d'onde du laser était située dans l'UV (148,134,131,124,138,181) alors que dans notre montage expérimental, un laser infra rouge a été utilisé (1064 nm). Une autre équipe utilise également le même type de laser pour les LAB pour (182,98). Les rayonnements UV de l'environnement sont connus pour leurs effets mutagènes à long terme (183,184) et les lasers UV sont utilisés en dermatologie pour leurs effets biologiques directs (185). Le laser UV peuvent altérer la structure de l'ADN (186) et provoquer la libération de radicaux libres oxygénés (187). Cependant, l'utilisation de lasers UV pour le LAB ne semble pas avoir d'effets délétères sur l'ADN (147) ni sur la survie cellulaire (131). Dans l'étude de Doraiswamy et coll (138), le MAPLE-DW a été utilisé avec une couche absorbante de polymère (triazène) afin de diminuer l'énergie du laser UV (193 nm) et donc de limiter les effets biologiques négatifs de cette longueur d'onde. La présence de cette couche absorbante a permis de réduire l'énergie du laser nécessaire à l'éjection des gouttes. Les auteurs ont montré qu'il était possible d'imprimer les cellules B35 avec une bonne résolution et une viabilité importante (138).
En ce qui concerne les lasers situés dans l'infra-rouge, les tissus biologiques sont transparents à cette longueur d'onde. L'innocuité des lasers infra-rouges sur les tissus biologiques est donc plus certaine et il est donc permis d'envisager des utilisations *in vitro* et *in vivo* avec plus de sécurité. Ainsi, nous avons observé dans ce travail que la source laser utilisée n'avait pas d'effet négatif sur la survie cellulaire après impression *in vitro* et que l'effet d'une irradiation laser *in vivo* sur les méninges de souris était très limité. En effet, une brève réaction inflammatoire (7jours) est apparue lorsque les tissus nerveux ont été soumis à une irradiation focalisée, mais l'analyse histologique n'a montré aucune anomalie (Page 97).

L'interface informatique de la station de travail permettait d'ajuster l'ensemble des paramètres d'impression liés au laser (énergie, fréquence), aux scanners (vitesse, motif imprimé) ou à l'entrefer, sur une ou plusieurs lames donneuses (jusqu'à 5). L'automatisation de l'impression est un avantage certain car elle permet de tester plusieurs conditions en parallèle: ainsi, nous avons pu évaluer lors d'une même impression la viabilité des cellules Eahy926 imprimées avec différentes énergies, sur un même échantillon (Page 73) (168). D'autre part, l'automatisation permet de limiter les facteurs de variation des conditions expérimentales liées à l'environnement, à la préparation des lames ou encore à la variabilité entre opérateur.
Pour les impressions *in situ* et *in vivo*, nous avons fabriqué un support spécifique réalisé sur mesure pour placer les souris dans la zone d'impression. La difficulté rencontrée pour cette expérimentation était liée à la course limitée des platines de translation qui n'autorisaient pas toujours un placement direct de la souris. En effet, le prototype n'avait été développé

initialement que pour des applications *in vitro*.
La caméra placée au dessus du laser permettait d'ajuster le plan de focalisation et de localiser précisément la zone d'impression pour chaque échantillon. Lors des impressions *in vivo*, cette fonctionnalité était indispensable car chaque souris devait être positionnée indépendamment en fonction de sa morphologie et de la position du défaut osseux, afin d'imprimer les couches de nHA au centre du défaut osseux. Pour les impressions *in vitro*, la focalisation était réalisée automatiquement car les supports de verre utilisés étaient toujours identiques.

Nous avons systématiquement utilisé une couche absorbante métallique d'or ou de titane sur la lame donneuse car la lame de verre et les hydrogels étaient transparents à la longueur d'onde infra-rouge. La couche étant sacrifiée pendant l'impression, notre technique est similaire au Bio-LP, même si nous utilisons une couche absorbante plus fine (40 à 60 nm) que cette méthode (au moins 100 nm) (125). Nous avons obtenu des résultats similaires avec l'or ou le titane, même si nous avons pu observer que les débris métalliques étaient plus nombreux sur la lame receveuse après impression lorsque l'or était choisi. Au final, le revêtement de titane semble mieux adapté pour plusieurs raisons: tout d'abord, on recueille très peu de débris sur la lame receveuse, ce qui limite les effets cellulaires éventuels de ces nanoparticules. Ensuite, d'un point de vue pratique, il est plus simple d'étaler l'hydrogel sur la lame donneuse recouverte de titane car le revêtement ne se détache pas lors de l'étalement, contrairement à l'or. Cependant, la présence de cette couche absorbante peut être problématique car l'effet biologique réel des débris métalliques imprimés avec les éléments biologiques n'a pas été étudié à ce jour. L'utilisation d'une membrane de polyimide à la place de la couche absorbante métallique semble être une alternative prometteuse car l'éjection de la goutte se fait grâce à la déformation de cette membrane, et ne dépose pas de débris sur la lame receveuse. La membrane doit ensuite être changée après utilisation (124).

La station de travail a été placée dans une salle adaptée à la culture cellulaire et les lames donneuses et receveuses étaient stérilisées avant utilisation. L'étalement des hydrogels et des solutions de cellules se faisait sous hotte à flux laminaire, puis les lames donneuses et receveuses étaient transportées vers la zone d'impression dans des boites de pétri stériles. Bien que les conditions de stérilité n'étaient pas parfaites, nous avons rencontré très peu de problèmes de contamination, car les manipulations hors de la hotte étaient très rapides (quelques minutes) et protégées par les boites de pétri.

La principale limite du dispositif expérimental que nous avons utilisé dans le cadre de ce travail est l'étape d'étalement de la solution d'encre sur la lame donneuse. En effet, il s'agit d'une étape « manuelle » du processus d'impression, elle n'est donc pas entièrement contrôlée et peut être soumise à variation entre opérateurs. Pourtant, c'est une étape cruciale car l'homogénéité et la finesse de la couche d'hydrogel conditionnent la formation du jet et la réussite de l'impression. De plus, on a pu montrer qu'une relation existait entre l'épaisseur de l'hydrogel et l'énergie nécessaire à l'éjection (172). Par ailleurs, le problème de l'évaporation de la fine couche d'hydrogel étalée sur la lame donneuse (60 µm) n'est que partiellement résolu par l'utilisation de glycérol et par le maintien d'une hygrométrie élevée et d'une température modérée dans la pièce. Ainsi, chaque lame donneuse ne peut être utilisée que quelques minutes au maximum, ce qui implique que les lames doivent être fréquemment renouvelées et qu'une quantité importantes de cellules non imprimées sont perdues à chaque manipulation.
Plus généralement, comme le LAB n'imprime que de faibles volumes (quelques pl à quelques dizaines de picolitre par goutte (181)), les applications en ingénierie tissulaire ne peuvent se concevoir que pour la fabrication de micro-tissus avec le prototype actuel. Le LAB permet d'imprimer de fortes densités cellulaires avec une résolution importante (173), mais il faudra certainement coupler cette technologie avec une autre méthode capable d'imprimer des volumes importants de matériaux « supports » (matrice extra-cellulaire), même si la résolution

est moins élevée que le LAB. Il pourra s'agir d'un système d'extrusion qui sera utilisé pour imprimer différents hydrogels ou des polymères, avec également la possibilité de gélifier ou réticuler ces matériaux par ajout d'un agent spécifique ou irradiation UV si des agents réticulants sont présents dans le matériau (Imprimante Fab@home).

La prochaine machine de bioprinting devra nécessairement regrouper plusieurs technologies de micro-impression d'éléments biologiques afin de profiter des avantages de chaque technique. Ainsi, on peut imaginer continuer à utiliser le LAB pour organiser les cellules car c'est la technique qui permet actuellement d'obtenir les meilleurs résultats en terme de résolution, de débit et de densité. Pour la mise en place de la matrice extra-cellulaire, un système d'extrusion de matériaux en phase visqueuse couplée à une technique de gélification servira à donner un volume 3D au matériau tout en apportant des propriétés mécaniques. Ces éléments devront être intégrés dans une station de travail placée sous une hotte à flux laminaire, avec une température et une hygrométrie contrôlées. Il faudra mettre au point des modules receveurs spécifiques pour les impressions *in vitro* ou les impressions *in situ* et *in vivo*. Le logiciel de pilotage de la machine permettra de paramétrer les différents modules d'impression (LAB, Extrusion…) et il devra également intégrer un système d'analyse d'images permettant de définir précisément la zone d'impression. Enfin, les développements futurs de la partie informatique devront se focaliser sur la création de substituts tissulaires à partir d'images radiologiques, à la fois pour des études *in vitro* ou *in vivo*.

Ces considérations technologiques sur le LAB ont été abordées dans deux publications acceptées (121,172).

CONCLUSIONS

Le point de départ de ce travail était l'étude d'un procédé de micro-impression d'éléments biologiques assistée par laser (LAB), pour évaluer une nouvelle approche en ingénierie tissulaire qui consiste à fabriquer les tissus par un assemblage de couches successives d'encres biologiques.
Nous avons montré que la préparation des encres d'hydroxyapatite nano-cristalline et des encres de cellules devait respecter des paramètres de biocompatibilité et de rhéologie spécifiques. Ensuite, ces matériaux ont été imprimés par LAB, sans modifier les propriétés initiales des encres. De plus nous avons mis en évidence que le LAB permettait d'obtenir à la fois une résolution importante (50 à 100 μm), mais aussi une forte densité de cellules au sein des gouttes. Ainsi, le LAB permet d'imprimer des encres beaucoup plus concentrées que les autres méthodes de micro-impression d'éléments biologiques.
Ensuite, nous avons cherché à réaliser des assemblages tridimensionnels de nHA *in vitro* par LAB, mais il était difficile d'imprimer des volumes importants de matériau et les propriétés mécaniques des structures obtenues étaient faibles. Pour répondre à ces limites, nous avons utilisé une méthode combinant le LAB et des membranes de PCL superposées (Biopapers) afin d'augmenter le volume et la résistance mécanique des constructions. Ce modèle de matériaux multi-couches a montré son efficacité *in vivo* chez la souris NOG pour la prolifération de cellules MG63 imprimées par LAB. Cette expérience a montré qu'une organisation tridimensionnelle couche par couche des cellules et du PCL était plus favorable à la prolifération cellulaire qu'un ensemencement de cellules sur le dessus de trois membranes de PCL.

Finalement, nous avons évalué l'intérêt d'imprimer directement les matériaux *in vivo* et *in situ*, sans maturation *in vitro*. Cette étape *in vitro* est peut-être superflue pour le bioprinting car les cellules sont placées directement au centre du matériau. Nous avons donc réalisé des impressions *in vivo* et *in situ* afin de prouver que ce concept était réalisable techniquement. Nous avons adapté la station d'impression pour les impressions *in vivo*, puis nous avons imprimé l'encre de nHA dans des défauts osseux critiques de calvaria. L'analyse des échantillons a confirmé que le matériau était bien imprimé, cependant l'encre n'est pas restée en place et la reconstruction osseuse était inconstante. Les perspectives à ce niveau sont de modifier les hydrogels en leur permettant par exemple de réticuler sur le site d'impression. Enfin, il faudra adapter la station de travail au bioprinting *in vivo* pour augmenter la précision et la reproductibilité des expériences.

Nous avons donc montré que plusieurs matériaux intéressants en ingénierie du tissu osseux pouvaient être imprimés par LAB, sans modification de leurs propriétés biologiques ou physico-chimiques. A l'issue de ce travail, il apparaît nécessaire de coupler le LAB à d'autres méthodes de prototypage rapide (membranes de PCL, membranes de collagène, extrusion d'hydrogels) afin d'apporter des volumes significatifs de matrice extra-cellulaire pour réaliser de réelles structures tridimensionnelles.
Il est probable que les méthodes de biofabrication et de bioprinting deviendront dans un futur proche des techniques courantes de laboratoire pour des études fondamentales *in vitro*, mais également pour des applications cliniques prenant en compte les principes de la fabrication tissulaire couche par couche.
Les recherches futures dans le domaine du bioprinting et de la biofabrication ne doivent donc pas se limiter à des développements technologiques toujours plus perfectionnés mais trouver des applications où la spécificité de ces méthodes permettra des avancées dans le domaine de l'ingénierie et de la régénération tissulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. Science. 1993 Mai 14;260(5110):920-926.

2. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. Cell. 2007 Aoû;130(4):601-10.

3. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol. 2004;22(2):80-86.

4. Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. Trends Biotechnol. 2004 Juillet;22(7):354-362.

5. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. Biomaterials. 2009 Avr;30(12):2164-2174.

6. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. J Biomater Sci Polym Ed. 2001;12(1):107-124.

7. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials. 2005 Sep;26(27):5474-5491.

8. Seong JM, Kim B, Park J, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang Y. Stem cells in bone tissue engineering. Biomed Mater. 2010 Oct 6;5(6):062001.

9. Catros S, Guillemot F, Amédée J, Fricain J. Mise au point: Applications Cliniques de l'Ingénierie Tissulaire Osseuse en Chirurgie Orale et Maxillo-Faciale. Médecine Buccale Chirurgie Buccale. sous presse;

10. Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, Tanihara M. Prolonged ectopic calcification induced by BMP-2-derived synthetic peptide. J Biomed Mater Res A. 2004 Juillet;70(1):115-21.

11. Phillippi JA, Miller E, Weiss L, Huard J, Waggoner A, Campbell P. Microenvironments engineered by inkjet bioprinting spatially direct adult stem cells toward muscle- and bone-like subpopulations. Stem Cells. 2008 Jan;26(1):127-34.

12. Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration. Tissue Eng B. 2008 3;14(1):105-118.

13. Lee KH. Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application. Yonsei Med. J. 2000 Déc;41(6):774-779.

14. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. N Engl J Med. 2007 Oct 4;357(14):1451-3.

15. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. Lancet. 2006 Avr 15;367(9518):1241-6.

16. Elloumi-Hannachi I, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering: a unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine. J Intern Med. 2010 1;267(1):54-70.

17. Sachlos E, Czernuszka J. Making Tissue Engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. Eur Cells Mat. 2003;5:29-40.

18. Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Culture of organized cell communities. Advanced Drug Delivery Reviews. 1998 Aoû 3;33(1-2):15-30.

19. Ko HCH, Milthorpe BK, McFarland CD. Engineering thick tissues--the vascularisation problem. Eur Cell Mater. 2007;14:1-18; discussion 18-9.

20. Griffith LG, Naughton G. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. Science. 2002;295(5557):1009-1014.

21. Chu T-G, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. Biomaterials. 2002 Mar;23(5):1283-1293.

22. Badylak SF, Nerem RM. Progress in tissue engineering and regenerative medicine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010 Fév 23;107(8):3285-3286.

23. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 Mar;38(3):201-209.

24. Orringer JS, Shaw WW, Borud LJ, Freymiller EG, Wang SA, Markowitz BL. Total mandibular and lower lip reconstruction with a prefabricated osteocutaneous free flap. Plast. Reconstr. Surg. 1999 Sep;104(3):793-797.

25. Warnke PH, Springer ING, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. Lancet. 2004 Aoû;364(9436):766-70.

26. Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U, Tsiridis E, di Silvio L. Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006 Mar;35(3):265-269.

27. Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, et al. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. Int J Oral Maxillofac Surg. 2010 Avr;39(4):379-387.

28. Goodger N, Wang J, Smagalski G, Hepworth B. Methylmethacrylate as a Space Maintainer in Mandibular Reconstruction. J Oral Maxillofac Surg. 2005 Juillet;63(7):1048-1051.

29. Moghadam HG, Urist MR, Sandor GK, Clokie CM. Successful mandibular reconstruction using a BMP bioimplant. J Craniofac Surg. 2001 Mar;12(2):119-127;

discussion 128.

30. Ferretti C, Ripamonti U. Human segmental mandibular defects treated with naturally derived bone morphogenetic proteins. J Craniofac Surg. 2002 Mai;13(3):434-444.

31. Warnke PH, Coren AJ. First experiences with recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1) in a human case in maxillofacial surgery. Plast. Reconstr. Surg. 2003 Jun;111(7):2471-2472.

32. Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, Acil Y, Bolte H, Kosmahl M, et al. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. Biomaterials. 2006 Jun;27(17):3163-3167.

33. Pradel W, Eckelt U, Lauer G. Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Mar;101(3):285-290.

34. Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. Int J Oral Maxillofac Implants. 2006 Fév;21(1):141-147.

35. Carter TG, Brar PS, Tolas A, Beirne OR. Off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for reconstruction of mandibular bone defects in humans. J. Oral Maxillofac. Surg. 2008 Jul;66(7):1417-1425.

36. Clokie CML, Sándor GKB. Reconstruction of 10 major mandibular defects using bioimplants containing BMP-7. J Can Dent Assoc. 2008 Fév;74(1):67-72.

37. Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). J. Oral Maxillofac. Surg. 2008 Avr;66(4):616-624.

38. Zwetyenga N, Catros S, Emparanza A, Deminiere C, Siberchicot F, Fricain J. Mandibular reconstruction using induced membranes with autologous cancellous bone graft and HA-betaTCP: animal model study and preliminary results in patients. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 Déc;38(12):1289-1297.

39. Schuckert K, Jopp S, Teoh S. Mandibular defect reconstruction using three-dimensional polycaprolactone scaffold in combination with platelet-rich plasma and recombinant human bone morphogenetic protein-2: de novo synthesis of bone in a single case. Tissue Eng Part A. 2009 Mar;15(3):493-499.

40. Lee J, Sung H, Jang J, Park Y, Min S, Kim E. Successful reconstruction of 15-cm segmental defects by bone marrow stem cells and resected autogenous bone graft in central hemangioma. J. Oral Maxillofac. Surg. 2010 Jan;68(1):188-194.

41. Catros S, Zwetyenga N, Bareille R, Brouillaud B, Renard M, Amédée J, et al. Subcutaneous induced membranes have no osteoinductive effect on macroporous HA-TCP in vivo. J Orthop Res. 2009;27(2):155-161.

42. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. Ann Chir Plast Esthet. 2000 Jun;45(3):346-

353.

43. Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. Orthop. Clin. North Am. 2010 Jan;41(1):27-37.

44. Chao M, Donovan T, Sotelo C, Carstens MH. In situ osteogenesis of hemimandible with rhBMP-2 in a 9-year-old boy: osteoinduction via stem cell concentration. J Craniofac Surg. 2006 Mai;17(3):405-412.

45. Carstens MH, Chin M, Ng T, Tom WK. Reconstruction of #7 facial cleft with distraction-assisted in situ osteogenesis (DISO): role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with Helistat-activated collagen implant. J Craniofac Surg. 2005 Nov;16(6):1023-1032.

46. Tom WK, Chin M, Ng T, Bouchoucha S, Carstens M. Distraction of rhBMP-2-generated mandible: how stable is the engineered bone in response to subsequent surgeries? J. Oral Maxillofac. Surg. 2008 Jul;66(7):1499-1505.

47. Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006 Jun;35(6):551-555.

48. Pradel W, Tausche E, Gollogly J, Lauer G. Spontaneous tooth eruption after alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered bone: a case report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 Avr;105(4):440-444.

49. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, et al. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Aoû;108(2):e1-6.

50. Chin M, Ng T, Tom WK, Carstens M. Repair of alveolar clefts with recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) in patients with clefts. J Craniofac Surg. 2005 Sep;16(5):778-789.

51. Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. J. Oral Maxillofac. Surg. 2009 Sep;67(9):1947-1960.

52. Beaumont C, Schmidt RJ, Tatakis DN, Zafiropoulos G. Use of engineered bone for sinus augmentation. J. Periodontol. 2008 Mar;79(3):541-548.

53. Mangano C, Piattelli A, Mangano A, Mangano F, Mangano A, Iezzi G, et al. Combining scaffolds and osteogenic cells in regenerative bone surgery: a preliminary histological report in human maxillary sinus augmentation. Clin Implant Dent Relat Res. 2009 Oct;11 Suppl 1:e92-102.

54. Voss P, Sauerbier S, Wiedmann-Al-Ahmad M, Zizelmann C, Stricker A, Schmelzeisen R, et al. Bone regeneration in sinus lifts: comparing tissue-engineered bone and iliac bone. Br J Oral Maxillofac Surg. 2010 Mar;48(2):121-126.

55. Schmelzeisen R, Schimming R, Sittinger M. Making bone: implant insertion into tissue-

engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report. J Craniomaxillofac Surg. 2003 Fév;31(1):34-39.

56. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. J. Oral Maxillofac. Surg. 2004 Jun;62(6):724-729.

57. Strietzel FP. Tissue-engineered bone for lateral alveolar ridge augmentation: a case report. Int J Oral Maxillofac Implants. 2006 Fév;21(1):131-135.

58. Springer IN, Nocini PF, Schlegel KA, De Santis D, Park J, Warnke PH, et al. Two techniques for the preparation of cell-scaffold constructs suitable for sinus augmentation: steps into clinical application. Tissue Eng. 2006 Sep;12(9):2649-2656.

59. Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. J. Periodontol. 2008 Mai;79(5):811-818.

60. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. Eur Cell Mater. 2009;18:75-83.

61. Kulakov AA, Goldshtein DV, Grigoryan AS, Rzhaninova AA, Alekseeva IS, Arutyunyan IV, et al. Clinical study of the efficiency of combined cell transplant on the basis of multipotent mesenchymal stromal adipose tissue cells in patients with pronounced deficit of the maxillary and mandibulary bone tissue. Bull. Exp. Biol. Med. 2008 Oct;146(4):522-525.

62. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Kohgo T, Hibi H, Nagasaka T, et al. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6-year follow-up. Tissue Eng Part A. 2008 Oct;14(10):1699-1707.

63. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 Aoû;106(2):203-209.

64. Ueda M, Yamada Y, Kagami H, Hibi H. Injectable bone applied for ridge augmentation and dental implant placement: human progress study. Implant Dent. 2008 Mar;17(1):82-90.

65. Zizelmann C, Schoen R, Metzger MC, Schmelzeisen R, Schramm A, Dott B, et al. Bone formation after sinus augmentation with engineered bone. Clin Oral Implants Res. 2007 Fév;18(1):69-73.

66. Fuerst G, Strbac GD, Vasak C, Tangl S, Leber J, Gahleitner A, et al. Are culture-expanded autogenous bone cells a clinically reliable option for sinus grafting? Clin Oral Implants Res. 2009 Fév;20(2):135-139.

67. Koch FP, Becker J, Terheyden H, Capsius B, Wagner W. A prospective, randomized pilot study on the safety and efficacy of recombinant human growth and differentiation factor-

5 coated onto beta-tricalcium phosphate for sinus lift augmentation. Clin Oral Implants Res. 2010 Jun 8;sous presse.

68. Schuckert K, Jopp S, Osadnik M. Modern Bone Regeneration Instead of Bone Transplantation: A Combination of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Platelet-Rich Plasma for the Vertical Augmentation of the Maxillary Bone-A Single Case Report. Tissue Eng Part C Methods. 2010 Avr 26;sous presse.

69. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. J. Periodontol. 2000 Aoû;71(8):1241-1257.

70. Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle CHF, Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. Clin Oral Implants Res. 2003 Oct;14(5):556-568.

71. Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. J. Oral Maxillofac. Surg. 2005 Déc;63(12):1693-1707.

72. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. Cell Transplant. 2004;13(4):343-355.

73. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. Biomaterials. 2008 Jul;29(21):3053-3061.

74. Haute Autorité de Santé. Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations. 2000;

75. Baqain ZH, Anabtawi M, Karaky AA, Malkawi Z. Morbidity from anterior iliac crest bone harvesting for secondary alveolar bone grafting: an outcome assessment study. J. Oral Maxillofac. Surg. 2009 Mar;67(3):570-575.

76. Schaaf H, Lendeckel S, Howaldt H, Streckbein P. Donor site morbidity after bone harvesting from the anterior iliac crest. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Jan;109(1):52-58.

77. Boyapati L, Wang H. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. Implant Dent. 2006 Jun;15(2):160-170.

78. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J. Oral Maxillofac. Surg. 2004 Avr;62(4):489-496.

79. Gimbel M, Ashley RK, Sisodia M, Gabbay JS, Wasson KL, Heller J, et al. Repair of alveolar cleft defects: reduced morbidity with bone marrow stem cells in a resorbable matrix. J Craniofac Surg. 2007 Jul;18(4):895-901.

80. Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human Bone-Marrow And Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User's Guide. Stem Cells Dev. 2010 Mai 20;sous presse.

81. Ebara S, Nakayama K. Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity. Spine. 2002 Aoû 15;27(16 Suppl 1):S10-15.

82. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. J Bone Joint Surg Am. 2002 Déc;84-A(12):2123-2134.

83. Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. J Orthop Res. 2004 Jan;22(1):73-9.

84. Liu Tsang V, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. Advanced Drug Delivery Reviews. 2004 Sep 22;56(11):1635-1647.

85. Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. Biomaterials. 2003 Juin;24(13):2363-2378.

86. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends in Biotechnology. 2003 Avr;21(4):157-161.

87. Bai S, Bo B, Bi Y, Wang B, Zhao J, Liu Y, et al. CAD/CAM surface templates as an alternative to the intermediate wafer in orthognathic surgery. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Aoû 31;sous presse.

88. Herlin C, Koppe M, Béziat J, Gleizal A. Rapid prototyping in craniofacial surgery: Using a positioning guide after zygomatic osteotomy- A case report. J Craniomaxillofac Surg. 2010 Aoû 31;sous presse.

89. Ibrahim D, Broilo TL, Heitz C, de Oliveira MG, de Oliveira HW, Nobre SMW, et al. Dimensional error of selective laser sintering, three-dimensional printing and PolyJet models in the reproduction of mandibular anatomy. J Craniomaxillofac Surg. 2009 Avr;37(3):167-173.

90. Levy RA, Chu TM, Halloran JW, Feinberg SE, Hollister S. CT-generated porous hydroxyapatite orbital floor prosthesis as a prototype bioimplant. AJNR Am J Neuroradiol. 1997 Sep;18(8):1522-1525.

91. Limpanuphap S, Derby B. Manufacture of biomaterials by a novel printing process. J Mater Sci Mater Med. 2002 Déc;13(12):1163-1166.

92. Michna S, Wu W, Lewis JA. Concentrated hydroxyapatite inks for direct-write assembly of 3-D periodic scaffolds. Biomaterials. 2005 Oct;26(28):5632-5639.

93. Moroni L, Licht R, de Boer J, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Fiber diameter and texture of electrospun PEOT/PBT scaffolds influence human mesenchymal stem cell proliferation and morphology, and the release of incorporated compounds. Biomaterials. 2006 Oct;27(28):4911-4922.

94. Nandakumar A, Fernandes H, de Boer J, Moroni L, Habibovic P, van Blitterswijk CA. Fabrication of Bioactive Composite Scaffolds by Electrospinning for Bone Regeneration. Macromol. Biosci. 2010 8;:sous presse.

95. Soliman S, Pagliari S, Rinaldi A, Forte G, Fiaccavento R, Pagliari F, et al. Multiscale three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering via multimodal electrospinning. Acta Biomater. 2010 Avr;6(4):1227-1237.

96. Centola M, Rainer A, Spadaccio C, De Porcellinis S, Genovese JA, Trombetta M. Combining electrospinning and fused deposition modeling for the fabrication of a hybrid vascular graft. Biofabrication. 2010 Mar;2(1):014102.

97. Ekaputra AK, Prestwich GD, Cool SM, Hutmacher DW. Combining electrospun scaffolds with electrosprayed hydrogels leads to three-dimensional cellularization of hybrid constructs. Biomacromolecules. 2008 Aoû;9(8):2097-2103.

98. Ovsianikov A, Gruene M, Pflaum M, Koch L, Maiorana F, Wilhelmi M, et al. Laser printing of cells into 3D scaffolds. Biofabrication. 2010 Mar;2(1):014104.

99. Chang R, Nam J, Sun W. Direct Cell Writing of 3D Microorgan for In Vitro Pharmacokinetic Model. Tissue Eng Part C Methods. 2008 Juin;14(2):157-66.

100. Arnold CB, Serra P, Piqué A. Laser Direct-Write Techniques for Printing of Complex Materials. MRS Bulletin. 2007;32.

101. Ringeisen BR, Othon CM, Barron JA, Young D, Spargo BJ. Jet-based methods to print living cells. Biotechnol J. 2006 Sep;1(9):930-48.

102. Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. Tissue Eng. 2005 Déc;11(11-12):1658-1666.

103. Saunders RE, Gough JE, Derby B. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. Biomaterials. 2008 Jan;29(2):193-203.

104. Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth EA, Markwald RR. Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2003 Jun;272(2):497-502.

105. Wilson WC, Boland T. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2003 Jun;272(2):491-496.

106. Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T. Inkjet printing of viable mammalian cells. Biomaterials. 2005 Jan;26(1):93-99.

107. Xu T, Gregory CA, Molnar P, Cui X, Jalota S, Bhaduri SB, et al. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. Biomaterials. 2006 Jul;27(19):3580-3588.

108. Xu T, Baicu C, Aho M, Zile M, Boland T. Fabrication and characterization of bio-

engineered cardiac pseudo tissues. Biofabrication. 2009 Sep;1(3):035001.

109. Boland T, Tao X, Damon BJ, Manley B, Kesari P, Jalota S, et al. Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs. Materials Science and Engineering: C. 2007 Avr;27(3):372-376.

110. Boland T, Xu T, Damon B, Cui X. Application of inkjet printing to tissue engineering. Biotechnol J. 2006 Sep;1(9):910-7.

111. Nakamura M, Iwanaga S, Henmi C, Arai K, Nishiyama Y. Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. Biofabrication. 2010 Mar;2(1):014110.

112. Cooper GM, Miller ED, Decesare GE, Usas A, Lensie EL, Bykowski MR, et al. Inkjet-Based Biopatterning of Bone Morphogenetic Protein-2 to Spatially Control Calvarial Bone Formation. Tissue Eng Part A. 2010 Fév 16;16(5).

113. Fedorovich NE, de Wijn JR, Verbout AJ, Alblas J, Dhert WJA. Three-Dimensional Fiber Deposition of Cell-Laden, Viable, Patterned Constructs for Bone Tissue Printing. Tissue Eng. 2008 Jan 3;14(1):127-133.

114. Norotte C, Marga FS, Niklason LE, Forgacs G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. Biomaterials. 2009 Oct;30(30):5910-5917.

115. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. PLoS ONE. 2008;3(1):e1451.

116. Mironov V, Trusk T, Kasyanov V, Little S, Swaja R, Markwald R. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. Biofabrication. 2009;1(2):022001.

117. Mironov V, Kasyanov V, Markwald RR. Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication. Trends Biotechnol. 2008 Juin;26(6):338-44.

118. Mironov V, Reis N, Derby B. Review: Bioprinting: A Beginning. Tissue Eng. 2006 4;12(4):631-634.

119. Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. Biomed Microdevices. 2004 Jun;6(2):139-147.

120. Koch L, Kuhn S, Sorg H, Gruene M, Schlie S, Gaebel R, et al. Laser Printing of Skin Cells and Human Stem Cells. Tissue Engineering Part C: Methods. 2009 12;:091221133515000.

121. Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B, Lopez J, Faucon M, et al. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. Acta Biomaterialia. 2010 Juillet;6(7):2494-2500.

122. Ringeisen BR, Chrisey DB, Piqué A, Young HD, Jones-Meehan J, Modi R, et al.

Generation of mesoscopic patterns of viable Escherichia coli by ambient laser transfer. Biomaterials. 2002 Jan;23(1):161-166.

123. Hopp B, Smausz T, Kresz N, Barna N, Bor Z, Kolozsvári L, et al. Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. Tissue Engineering. 2005 Déc;11(11-12):1817-23.

124. Brown MS, Kattamis NT, Arnold CB. Time-resolved study of polyimide absorption layers for blister-actuated laser-induced forward transfer. J. Appl. Phys. 2010;107(8):083103.

125. Schiele NR, Corr DT, Huang Y, Raof NA, Xie Y, Chrisey DB. Laser-based direct-write techniques for cell printing. Biofabrication. 2010 9;2(3):032001.

126. Mezel C, Hallo L, Souquet A, Breil J, Hebert D, Guillemot F. Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime. Phys. Plasmas. 2009 Déc;16(12):123112-12.

127. Young D, Auyeung RCY, Piqué A, Chrisey DB, Dlott DD. Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy. Applied Surface Science. 2002 Sep 30;197-198:181-187.

128. Duocastella M, Fernandez-Pradas J, Morenza JL, SERRA P. Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids. Journal of Applied Physics. :in press.

129. Gruene M, Deiwick A, Koch L, Schlie S, Unger C, Hofmann N, et al. Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts. Tissue Eng Part C. 2010 8;:100830145320029.

130. Wu PK, Ringeisen BR. Development of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human umbilical vein smooth muscle cell (HUVSMC) branch/stem structures on hydrogel layers via biological laser printing (BioLP). Biofabrication. 2010 3;2(1):014111.

131. Ringeisen BR, Kim H, Barron JA, Krizman DB, Chrisey DB, Jackman S, et al. Laser Printing of Pluripotent Embryonal Carcinoma Cells. Tissue eng. 2004;10(3-4):483-491.

132. Lin Y, Huang Y, Wang G, Tzeng TJ, Chrisey DB. Effect of laser fluence on yeast cell viability in laser-assisted cell transfer. J. Appl. Phys. 2009;106(4):043106.

133. Lin Y, Huang G, Huang Y, Tzeng TJ, Chrisey D. Effect of laser fluence in laser assisted direct writing of human colon cancer cell. Rapid Prototyp J. 2010;16(3):202 - 208.

134. Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB. Application of laser printing to mammalian cells. Thin Solid Films. 2004 Avr 1;453-454:383-387.

135. Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR. Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. Ann Biomed Eng. 2005 Fév;33(2):121-130.

136. Chen C, Barron J, Ringeisen B. Cell patterning without chemical surface modification: Cell–cell interactions between printed bovine aortic endothelial cells (BAEC) on a

homogeneous cell-adherent hydrogel. Appl Surf Sci. 2006 Oct;252(24):8641-8645.

137. Patz TM, Doraiswamy A, Narayan RJ, He W, Zhong Y, Bellamkonda R, et al. Three-dimensional direct writing of B35 neuronal cells. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2006;78B(1):124-130.

138. Doraiswamy A, Narayan R, Lippert T, Urech L, Wokaun A, Nagel M, et al. Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer. Appl Surf Sci. 2006 Avr 30;252(13):4743-4747.

139. Doraiswamy A, Narayan RJ, Harris ML, Qadri SB, Modi R, Chrisey DB. Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2007;80A(3):635-643.

140. Kaji T, Ito S, Miyasaka H, Hosokawa Y, Masuhara H, Shukunami C, et al. Nondestructive micropatterning of living animal cells using focused femtosecond laser-induced impulsive force. Appl. Phys. Lett. 2007 Juillet 9;91(2):023904-3.

141. Kattamis NT, Purnick PE, Weiss R, Arnold CB. Thick film laser induced forward transfer for deposition of thermally and mechanically sensitive materials. Appl. Phys. Lett. 2007 Oct 22;91(17):171120-3.

142. Othon CM, Wu X, Anders JJ, Ringeisen BR. Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells. Biomedical Materials. 2008;3(3):034101.

143. Schiele NR, Koppes RA, Corr DT, Ellison KS, Thompson DM, Ligon LA, et al. Laser direct writing of combinatorial libraries of idealized cellular constructs: Biomedical applications. Appl Surf Sci. 2009 Mar;255(10):5444-5447.

144. Schiele NR, Chrisey DB, Corr DT. Gelatin-Based Laser Direct-Write Technique for the Precise Spatial Patterning of Cells. Tissue Engineering Part C: Methods. 2010 9;:100920040244035.

145. Ringeisen BR, Wu PK, Kim H, Piqué A, Auyeung RYC, Young HD, et al. Picoliter-scale protein microarrays by laser direct write. Biotechnol. Prog. 2002 Oct;18(5):1126-1129.

146. Barron JA, Young HD, Dlott DD, Darfler MM, Krizman DB, Ringeisen BR. Printing of protein microarrays via a capillary-free fluid jetting mechanism. Proteomics. 2005 Nov;5(16):4138-4144.

147. Colina M, Serra P, Fernández-Pradas J, Sevilla L, Morenza J. DNA deposition through laser induced forward transfer. Biosens Bioelec. 2005 Fév 15;20(8):1638-1642.

148. Dinca V, Ranella A, Farsari M, Kafetzopoulos D, Dinescu M, Popescu A, et al. Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer. Biomed Microdevices. 2008 Oct;10(5):719-25.

149. Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri MR, Sorrell CC. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. Materials & Design. 2003 Mai;24(3):197-202.

150. Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, et al. Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. Antimicrob. Agents Chemother. 1977;12(1):11-15.

151. Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fang TD, Fong KD, et al. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. Plast. Reconstr. Surg. 2004 Sep 1;114(3):713-720.

152. Cook M. The Anatomy of the Laboratory Mouse [Internet]. Available from: http://www.informatics.jax.org/cookbook/chapters/foreword.shtml

153. Wolf E, Röser K, Hahn M, Welkerling H, Delling G. Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: A new embedding method for routine application. Virchows Archiv. 1992 Jan 1;420(1):17-24.

154. Catros S, Guillemot F, Chanseau C, Laplaud E, Perez S, Bareille R, et al. Physico-chemical and biological properties of nano-hydroxyapatite synthesized at room temperature. IRBM. 2010;31:226-233.

155. Catros S, Fricain J, Guillotin B, Pippenger B, Bareille R, Remy M, et al. Laser-Assisted Bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. Acta Biomaterialia. Under Review;

156. Guillemot F, Mironov V, Nakamura M. Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). Biofabrication. 2010 3;2(1):010201.

157. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993;260(5110):920-926.

158. Nichol JW, Khademhosseini A. Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up. Soft Matter. 2009;5(7):1312-1319.

159. Oreffo RO, Driessens FC, Planell JA, Triffitt JT. Effects of novel calcium phosphate cements on human bone marrow fibroblastic cells. Tissue Eng. 1998;4(3):293-303.

160. Kasten P, Luginbühl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Bohner M, et al. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, [beta]-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. Biomaterials. 2003 Juillet;24(15):2593-2603.

161. Barralet J, Best S, Bonfield W. Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: An investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. J Biomed Mater Res. 1998;41(1):79-86.

162. Serra P, Fernandez-Pradas JM, Colina M, Duocastella M, Dominguez J, Morenza JL. Laser-induced forward Transfer: a Direct-writing Technique for Biosensors Preparation. JLMN. 2006 12;1(3):236-242.

163. Harris M, Doraiswamy A, Narayan R, Patz T, Chrisey D. Recent progress in CAD/CAM

laser direct-writing of biomaterials. mat sci eng. 2008 Avr 1;28(3):359-365.

164. Lejeune M, Chartier T, Dossou-Yovo C, Noguera R. Ink-jet printing of ceramic micro-pillar arrays. J Eur Ceram Soc. 2009 Mar;29(5):905-911.

165. Noguera R, Lejeune M, Chartier T. 3D fine scale ceramic components formed by ink-jet prototyping process. J Eur Ceram Soc. 2005;25(12):2055-2059.

166. Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. Biomaterials. 2010 Oct;31(28):7250-7256.

167. Lutolf MP, Blau HM. Artificial Stem Cell Niches. Advanced Materials. 2009;21(32-33):3255-3268.

168. Catros S, Guillotin B, Bacakova M, Fricain J, Guillemot F. Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting. Applied Surface Science. under review;

169. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979 Avr;76(4):1828-1832.

170. Ingber DE. Mechanical control of tissue growth: Function follows form. PNAS. 2005;102(33):11571-11572.

171. Wang W, Huang Y, Grujicic M, Chrisey DB. Study of Impact-Induced Mechanical Effects in Cell Direct Writing Using Smooth Particle Hydrodynamic Method. J. Manuf. Sci. Eng. 2008 Avr 0;130(2):021012-10.

172. Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. Nanomedicine. 2010 4;5(3):507-515.

173. Guillotin B, Souquet A, Catros S, Pippenger B, Bellance S, Bareille R, et al. Laser Assisted Bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. Biomaterials. 2010;31(28):7250-7256.

174. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. J. Immunol. 2005 Mai 15;174(10):6477-6489.

175. Auguste P, Gürsel DB, Lemière S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, et al. Inhibition of Fibroblast Growth Factor/Fibroblast Growth Factor Receptor Activity in Glioma Cells Impedes Tumor Growth by Both Angiogenesis-dependent and -independent Mechanisms. Cancer Research. 2001 Fév 2;61(4):1717 -1726.

176. Kim H, Song J, Kim H. Nanofiber Generation of Gelatin-Hydroxyapatite Biomimetics for Guided Tissue Regeneration. Adv Funct Mat. 2005;15(12):1988-1994.

177. Vigier S, Helary C, Fromigue O, Marie P, Giraud-Guille M. Collagen supramolecular and suprafibrillar organizations on osteoblasts long-term behavior: benefits for bone healing materials. J Biomed Mater Res A. 2010 Aoû;94(2):556-567.

178. Cinquin P, Troccaz J, Champleboux G, Lavallee S. SURGETICA at Grenoble: from computer assisted medical interventions to quality inspired surgery. Stud Health Technol Inform. 2004;100:117-129.

179. Binder K, Zhao W, Dice, D, Atala A, Yoo J. In situ bioprinting of the skin for burns; Seoul; Termis WC. 2009 Aoû 31;

180. Keriquel V, Guillemot F, Arnault I, Guillotin B, Miraux S, Amédée J, et al. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. Biofabrication. 2010 3;2(1):014101.

181. Duocastella M, Fernández-Pradas JM, Serra P, Morenza JL. Laser-induced Forward Transfer of Liquids for Miniaturized Biosensors Preparation. Journal of Laser Micro/Nanoengineering. 2008;3(1):1-4.

182. Gruene M, Deiwick A, Koch L, Schlie S, Unger C, Hofmann N, et al. Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts. Tissue Engineering Part C: Methods. 2010 8;:100830145320029.

183. Hietanen M. Health risks of exposure to non-ionizing radiation-myths or science-based evidence. Med Lav. 2006 Avr;97(2):184-188.

184. Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of visible light on the skin. Photochem. Photobiol. 2008 Avr;84(2):450-462.

185. Passeron T, Ortonne J. Use of the 308-nm excimer laser for psoriasis and vitiligo. Clin. Dermatol. 2006 Fév;24(1):33-42.

186. Botchway SW, Reynolds P, Parker AW, O'Neill P. Use of near infrared femtosecond lasers as sub-micron radiation microbeam for cell DNA damage and repair studies. Mutat. Res. 2010 Jun;704(1-3):38-44.

187. Crisostomo AG, Moreno RB, Navaratnam S, Wilkinson JA, Bisby RH. Generation of superoxide and singlet oxygen from alpha-tocopherolquinone and analogues. Free Radic. Res. 2007 Jun;41(6):730-737.

188. Miraux S, Massot P, Ribot EJ, Franconi J, Thiaudiere E. 3D TrueFISP imaging of mouse brain at 4.7T and 9.4T. J Magn Reson Imaging. 2008 Aoû;28(2):497-503.

189. Vilamitjana-Amédée J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand M. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. In vitro Cell. Dev. Biol. 1993;29(9):699-707.

190. Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. Am J Physiol Cell Physiol. 2002;282(4):C775-785.

191. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods. 2008 Jun;45(2):115-120.

192. Challita PM, Skelton D, El-Khoueiry A, Yu XJ, Weinberg K, Kohn DB. Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells. J. Virol. 1995 Fév;69(2):748-755.

INDEX DES TABLES ET DES ILLUSTRATIONS

Index des tables

Tableau 1: Chirurgie Osseuse Reconstructrice Maxillaire ou Mandibulaire.....13
Tableau 2: Chirurgie Osseuse Reconstructrice des Fentes Faciales.....13
Tableau 3: Chirurgie Osseuse Reconstructrice Préimplantaire.....15
Tableau 4: Etat de l'art sur la micro-impression de cellules par laser.....40
Tableau 5: Résultats des tests statistiques pour le coté Test (Mann-Whitney).....110
Tableau 6: Résultats des tests statistiques pour le coté Témoin (Mann-Whitney).....111

Index des illustrations

Figure 1: Schéma du principe général de l'ingénierie tissulaire: Après prélèvement, les cellules autologues sont amplifiées, différenciées et ensemencées sur un matériau macroporeux (scaffold) en présence de facteurs de croissance. Une phase de maturation in vitro ou in vivo est parfois utilisée avant l'implantation du néo-tissu chez le patient.....9
Figure 2: La limite de la colonisation cellulaire dans les matériaux macro-poreux est liée à la limite de diffusion de l'oxygène et des nutriments au sein du matériau; 11
Figure 3: Reconstruction Mandibulaire avec maturation in vivo. (a): défaut initial et modélisation du tissu à reconstruire (b): Cage en titane sur mesure comblée avec de l'os autogène, des blocs de BioOss et des BMP-2 / Maturation in vivo dans la muscle grand dorsal (c):Greffe du tissu néoformé après 8 semaines et scintigraphie montrant l'intégration du greffon.....20
Figure 4: Le concept de micro-impression d'éléments biologiques (Bioprinting): Le tissu est fabriqué par dépôt de couches successives d'encres biologiques (bioink). Il peut s'agir de cellules (rouge) et de matrice extracellulaire (bleu).....23
Figure 5: Planification d'une chirurgie orthognatique (haut A-F) puis réalisation de plaque d'ostéosynthèse sur mesure par Stéréolithographie (Bas, A). Les plaques sont ensuite coulées en métal et utilisées pour la chirurgie (Bas, B);.....25
Figure 6: Variation de la porosité de scaffolds produits par Fused Deposition Modeling.....26
Figure 7: Membranes de PCL tissées par elctrspinning.....27
Figure 8: Principe des imprimantes à jet d'encre piézo-électrique (a) et thermiques (b).....29
Figure 9: Imprimante “Bioplotter®“ utilisée pour l'extrusion d'hydrogels (Gauche). Résultats d'impressions d'alginate (a), d'agarose (b), de methylcellulose (c), de lutrol (d-f) (Droite).….31
Figure 10: Tubes formés par extrusion de sphéroïdes cellulaires et de “boudins“ d'agarose. (a) schéma de l'impression couche par couche; (b, d) vue finale des impressions; (c) Appareillage Organovo®; (d) vue du tube cellulaire après retrait de l'agarose.....31
Figure 11: Interaction entre le laser et la lame donneuse dans le MAPLE-DW (a), le LIFT (b) ou le Bio-LP (c);.....33
Figure 12: Paramètres impliqués dans le LAB.....34
Figure 13: Exemple d'éjection en régime “Sous Seuil“; Fluence = 19mJ/cm2; L'énergie laser provient de la gauche et le jet est projeté vers la droite de la figure.....35
Figure 14: Exemple d'éjection en régime de “Jet“; Fluence = 32 mJ/cm2.....35
Figure 15: Exemple d'éjection en régime “Explosion“ Fluence = 65 mJ/cm2; Imagerie Résolue en temps.....36
Figure 16: Mécanisme d'éjection des gouttes et régimes d'impression.....36
Figure 17: Prototype LASIT.....42
Figure 18: Vue des platines motorisées de la station de travail.....43

Figure 19: Fenêtre d'accueil du logiciel.....44
Figure 20: Détermination du nombre et de la position des lames donneuses.....44
Figure 21: Choix de l'outil d'impression.....45
Figure 22: Détermination de la trajectoire d'impression.....45
Figure 23: Méthodes de préparation de la couche d'encre sur la lame donneuse (a: Etalement au doctor blade; b: Etalement à la micro-pipette).....46
Figure 24: Observation de la luminescence émise par des cellules MG63 luc implantées dans des calvarias de souris. Dans cet exemple, le plateau d'émission est situé autour de 600 secondes.....54
Figure 25: Localisation des défauts osseux de calvaria (a: Défauts latéraux; b: Défauts centraux).....56
Figure 26: Mesure d'une tumeur sous cutanée chez la souris NOG avec un pied à coulisse micrométrique.....57
Figure 27: Vue tridimensionnelle d'un défaut osseux observé par micro-scanner avec superposition de la zone d'intérêt (tracée en jaune).....58
Figure 28: Observation par MET de la poudre de nHA (a: Examen morphologique des cristaux; b: Microanalyse X montrant un rapport P/Ca de 1.67).....60
Figure 29: Caractérisation de la nHA avant et après impression par LAB (a: FTIR; b: DRX) 61
Figure 30: Caractérisation biologique de la nHA avant impression (a: test au live dead sur des cellules MG63 cultivées 12 jours en présence du matériau; b: Observation en MEB des cellules MG63 cultivées 12 jours en présence du matériau; c droite: Test à la Phosphatase Alcaline après 3 jours de culture des MG63 en présence du matériau; c gauche: Contrôle de la Phosphatase Alcaline exprimée par les MG63 après 3 jours de culture).....62
Figure 31: Histologie non décalcifiée de défauts osseux critiques de calvaria comblés par nHA (droite) ou laissés vides (gauche) après 1 mois de cicatrisation.....62
Figure 32: Histologie non décalcifiée (haut) ou décalcifiée (bas) de défauts osseux critiques de calvaria comblés par nHA (droite) ou laissés vides (gauche) après 3 mois de cicatrisation.....63
Figure 33: Variation du diamètre des gouttes en fonction de l'énergie utilisée.....63
Figure 34: Variation des motifs avec l'encre de nHA imprimée par LAB.....64
Figure 35: Culture de cellules MG63 sur des motifs de nHA imprimés par LAB (a: Test au Live/Dead après 6 jours de culture sur un cercle de nHA; b: Détail du cercle observé en lumière blanche; c: Observation en MEB après 6 jours de culture montrant les agrégats de nHA sur le matériau imprimé).....65
Figure 36: Impression de cellules HOP imprimée sur Matrigel (a: Matrice de cellules colorées par le hoechst le jour de l'impression; b: Zoom de l'image a; c: Test au Live/Dead, 2e jour; d: Test au Live/Dead, 15e jour; e: Test à la phosphatase alcaline, 15e jour; f: Immuno-marquage de l'ostéocalcine, 15e jour).....66
Figure 37: Effet de l'énergie sur la viabilité cellulaire.....67
Figure 38: Effet de l'énergie et de l'épaisseur de Matrigel® sur la viabilité cellulaire.....68
Figure 39: Effet de la viscosité de l'encre sur la viabilité cellulaire après impression.....69
Figure 40: Témoins positifs et négatifs.....69
Figure 41: Cellules ADSC imprimées sur Matrigel®. Motif initial en cercles concentriques à J1 (a) et détail à J1 (b). Perte du motif imprimé à J7 (c) et détail à J7 (d).....70
Figure 42: Cellules ADSC - GFP imprimées sur Matrigel à 12h (a) et 48h (b). Témoin positif sur Matrigel® (c) et sur plastique (d) à 48h.....71
Figure 43: Observation en Microscopie optique de cellules ADSC-GFP réparties sur 2 plans: les cellules les plus superficielles sont rondes (a) et les cellules profondes sont étalées (b).…71
Figure 44: Observation en Microscopie confocale de cellules ADSC - GFP imprimées 24 heures après impression sur Matrigel®. Les cellules sont réparties dans toute l'épaisseur du Matrigel (100µm).....71
Figure 45: Cellules MG63 imprimées sur Matrigel (Test au Live/Dead 24 heures après

impression).....72
Figure 46: Impression séquentielle de nHA et de cellules HOP (a: Représentation schématique de l'expérimentation; b: Image en microscopie optique immédiatement après impression; c: Marquage des cellules en hoechst après 3 jours de culture; d: Marquage des cellules en hoechst après 6 jours de culture; e: Observations en MEB après 3 jours de culture; e: Observations en MEB après 6 jours de culture).....74
Figure 47: Marquage à la Phosphatase alcaline des cellules HOP imprimées sur un matelas de nHA après 6 jours de culture.....75
Figure 48: Impression de motifs de nHa et MG63 à partir de .bmp (a: Motif du tracé d'hydroxyapatite; b: Motif de l'impression de cellules; c: Résultat de l'impression).....75
Figure 49: Impression d'ADSC-Tomato sous forme de cercles concentriques et d'ADSC sous forme d'une croix.....75
Figure 50: Impression séquentielle en 2D de cellules Ea-hy926. (a): Cercle interne coloration à la calcéine; (b): Cercle externe, coloration au Dil-LDL; (c): La superposition des 2 images montre une zone de recouvrement entre les deux cercles due à la coalescence de leur interface 76
Figure 51: Schéma du motif imprimé en 3D avec nHA et résultat de l'impression observé en Microscopie Optique.....77
Figure 52: Observation en MEB de la surface de nHA imprimée. Grossissement de 40 x (a), 690 x (b) et 7000 x (c).....78
Figure 53: Impression d'hydroxyapatite sur ruban adhésif pour visualiser la tranche du matériau imprimé (a: impression sur scotch; b: résultat après retrait du scotch).....78
Figure 54: Observation de la tranche de 15 couches (a) et de 5 couches (b) de nHA imprimées sur verre 78
Figure 55: Membranes de PCL (a: vue macroscopique; b: observation en MEB: image Université de Twente).....79
Figure 56: Impression de cellules MG63 sur une membrane de PCL (a: vue macroscopique initiale après impression; b: vue d'un cercle de MG63 marqué au Live/Dead après 7 jours de culture; c: Observation après 7 jours de culture x10; d: Observation après 7 jours de culture x20).....79
Figure 57: Observation en MEB des cellules MG63 imprimées sur PCL après 7 jours de culture.....80
Figure 58: Cellules ADSC imprimées sur PCL (a: Marquage au Live/Dead après 6 jours de culture x10; b: Marquage au Live/Dead après 6 jours de culture x20).....80
Figure 59: Suivi du volume des tumeurs induites par l'injection sous cutanée de cellules ADSC ou MG63.....82
Figure 60: Suivi au photon imageur de la prolifération des cellules ADSC-Luc et MG63-Luc implantées en sous-cutané (a: 1jour; b: 7 jours; c: 14 jours; d: 21 jours; e: 28 jours) (le seuillage utilisé sur les images est identique à tous les temps).....83
Figure 61: Quantification de la prolifération des cellules ADSC-Luc et des cellules MG63-Luc au photon imageur.....84
Figure 62: Histologie d'un nodule MG63-Luc montrant de fines travées osseuses immatures (flèche) au sein d'un tissu fibreux (a) et une travée osseuse mature (b).....85
Figure 63: Histologie d'un nodule ADSC-Luc montrant de fines travées osseuses immatures (flèches) au sein du tissu adipeux (a) ou à proximité de tissu musculaire (b).....85
Figure 64: Schéma des assemblages comparés. Dans le modèle d'ensemencement, les cellules sont imprimées sur les 3 membranes superposées (Gauche). Dans le modèle de construction couche par couche, les cellules sont imprimées entre les membranes de PCL (Droite).....86
Figure 65: Suivi par bio-luminescence de la prolifération de cellules MG63 imprimées sur des membranes de PCL et implantées dans des défauts osseux de calvaria chez la souris NOG. La prolifération est plus importante du coté test (droit) que du coté témoin (gauche). Suivi à J7

(a); J14 (b); J21 (c); J28 (d); J49 (e) et J56 (f); (le seuillage utilisé sur les images est identique à tous les temps).....87
Figure 66: Quantification de la Prolifération cellulaire par Photon Imageur. Droite: coté Test; Gauche: Coté Témoin. Les différences sont significatives (*) à tous les temps étudiés (Test de Wilcoxon).....87
Figure 67: Quantification de la prolifération cellulaire au photon imageur du coté test.....88
Figure 68: Quantification de la prolifération cellulaire au photon imageur du coté témoin 89
Figure 69: Observation en Micro-scanner d'un échantillon 2 mois après la greffe. Il n'y a pas de reconstruction osseuse ni du coté test (droite), ni du coté témoin (gauche).....89
Figure 70: Quantification du volume osseux dans le volume total de la zone d'intérêt (BV/TV) à 2 mois. Il n'y a pas de différence entre les 2 conditions de l'étude (Test de Wilcoxon).....90
Figure 71: Coupe frontale de calvaria après 1 mois de cicatrisation. L'épaisseur du matériau cellularisé est plus importante du coté test (flèche) que du coté témoin (Histologie décalcifiée, HES X2).....90
Figure 72:Aspects du tissu néo-formé du coté contrôle (a) et du coté test (b). Des résidus de PCL sont visibles coté contrôle (*) et des nodules minéralisés sont observés coté test (flèche) (Histologie décalcifiée, HES X20).....91
Figure 73: Coupe frontale de calvaria après 2 mois de cicatrisation. (Histologie décalcifiée, HES X2).....91
Figure 74: Aspects du tissu néo-formé du coté contrôle (a) et du coté test (b). Quelques résidus de PCL sont visibles coté contrôle (*) (Histologie décalcifiée, HES X20).....91
Figure 75: Adaptation du module receveur permettant de réaliser des impressions in vivo dans des défauts osseux de calvaria de souris.....92
Figure 76: Suivi par IRM de l'inflammation au niveau de la dure mère après une irradiation laser focalisée dans des défauts osseux de calvaria (a: observation après 1 semaine; b: observation après 2 semaines).....92
Figure 77: Coupe en histologie décalcifiée de la calvaria de souris 15 jours après une irradiation laser focalisée sur la dure mère.....93
Figure 78: Histologie décalcifiée de la calvaria de souris après 1 semaine (a-b), 1 mois (c-d) et 3 mois (e-f) de cicatrisation. (a): coté test, 1 semaine: nHA imprimée au contact de la dure mère (flèche); (b); coté témoin, 1 semaine: nHA à distance de la dure mère; (c): coté test, 1 mois: Présence d'os mature et immature; (d): coté témoin, 1 mois: Présence de tissu fibreux; (e): coté test, 3 mois: Présence d''os mature; (f): Présence de tissu fibreux. (B: os; NT: Tissu nerveux; FT: Tissu Fibreux).....94
Figure 79: Images de micro-scanner obtenues après 1 semaine (a), 1 mois (b) et 3 mois (c) de cicatrisation après impression de nHA in vivo et in situ.....94
Figure 80: Quantification de la surface osseuse non reconstruite du coté test (a) et du coté témoin (b).....95
Figure 81: Comparaison au cours du temps de la reconstruction osseuse obtenue avec nHA imprimée in vivo et in situ.....96
Figure 82: Impression de cellules MG63-Luc chez la souris Nude dans un défaut central de calvaria (a): mise en place de la membrane de PCL (b): Membrane de PCL dans le défaut osseux avant impression (c): Cercle de cellules imprimé sur la membrane de PCL.....96
Figure 83: Observation de la luminescence sur une souris ayant reçu une impression de cellules MG63 dans un défaut osseux de calvaria (le seuillage utilisé sur les images est identique à tous les temps) (a-f: différents temps d'observation, entre 0 et 16 jours).....97
Figure 84: Quantification de la luminescence par photon-imageur après impression de cellules s MG63 dans un défaut osseux de calvaria.....97
Figure 85: Histologie décalcifiée (Coloration HES) des calvarias de souris à 1 mois. Une réparation osseuse partielle est présente du coté test (a) tandis qu'aucune réparation osseuse n'est présente coté témoin (b). Les flèches représentent les limites internes des défauts osseux.

.....98
Figure 86: Les deux approches de l'ingénierie tissulaire.....100
Figure 87: Modélisation numérique des deux impacts subis par les cellules lors de l'aterrissage sur un substrat recouvert d'un hydrogel. (a) premier impact lors de la transition entre air et hydrogel; (b,c): traversées de l'hydrogel par la cellule; (d):second impact à l'interface hydrogel-verre.....106

ANNEXES

1. PRÉPARATION DE MEMBRANES DE POLYCAPROLACTONE (PCL) PAR ELECTROSPINNING

Une poudre de PCL (M=42,5) (Aldrich) a été solubilisée dans du chloroforme (CHCl3) avec une concentration de 20% (w/v). Cette solution a ensuite été placée dans la seringue à débit contrôlé (Pompe KDS 100, KD Scientific) puis une puissance de 12 kV a été appliquée entre les deux pôles du générateur (NCE 30000, Heinzinger Electronic GmbH, Germany). La distance entre l'aiguille et le collecteur était de 20 cm. La solution de polymère était injectée dans la seringue vers l'extémité de l'aiguille avec un débit de 1ml/h. Des membranes rectangulaires de 10 cm par 20 cm ont été obtenues (93). Après préparation, des échantillons des membranes étaient observées par MEB pour contrôler le diamètre et la régularité du dépôt des fibres.

Les membranes de PCL ont été réalisées dans le laboratoire de régénération tissulaire de l'université de Twente aux Pays Bas.

2. MICRO-IRM

La micro- imagerie par résonance magnétique a été utilisée pour évaluer la réaction inflammatoire consécutive à l'irradiation laser sur les méninges de façon longitudinale, comme étude préliminaire à l'impression *in situ* et *in vivo* chez la souris (Page 97). Ce suivi longitudinal a été réalisé avec un Système Biospec® 4,7T horizontal (Bruker, Germany). Cet appareillage était équipé d'un insert de 6 cm capable d'une force maximale de 950mT.m^{-1} pour une résolution de 80µm. Les souris ont été anesthésiées à l'isofluorane (2%), puis elles ont été positionnées au niveau de l'aimant. L'acquisition des images en 3 dimensions a été faite avec la séquence TrueFISP (TE/TR = 3.2/6.4 ms, flip angle: 65°, FOV: 30 Å~ 18 Å~ 18 mm^2, matrice: 256 Å~ 96 Å~ 96 mm^2, résolution: 117 Å~ 188 Å~ 188 µm^2, orientation des coupes: coronales, Largeur du bandeau de réception: 195 Hz/pixel. La durée totale de l'acquisition était de 23 minutes environ (188,180).

Ces expérimentations ont été réalisées au Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536, Université Bordeaux 2.

3. ISOLATION DE CELLULES HOP

Les cellules HOPs ont été isolées à partir de cellules de moelle osseuse humaine prélevée à la crête iliaque chez des donneurs sains (20 à 50 ans) pendant des chirurgies de pose de prothèse totale de hanche. Les cellules ont été séparées du stroma par un passage séquentiel dans des aiguilles de diamètre décroissant (16, 18 et 21 gauge). Après 15 minutes de centrifugation à 800 G, le culot a été resuspendu dans du milieu IMDM supplémenté avec 10% de SVF et 10^{-8} M de dexamethasone (Sigma, St Louis, MO, USA). Les cellules ont ensuite été mises en culture avec une densité de 50000 cellules /cm^2 et incubées en atmosphère humide à 5% de CO2 à 37°C. Quatre jours plus tard, le milieu a été renouvelé (IMDM + 10% SVF (v/v) + 10^{-8} M dexamethasone), puis il a été changé tous les 4 à 5 jours (IMDM + 10% SVF (v/v)) (189,190).

L'isolation des cellules HOP a été réalisée dans le laboratoire Inserm U577 par Reine Bareille et Robin Siadous.

4. Isolation de Cellules ADSC

Les cellules ADSC ont été isolées et cultivées comme décrit précédemment (191) : Le tissu adipeux a été obtenu chez des patients donneurs lors de liposuccions. Les échantillons ont été découpés et digérés dans une solution de 0,1% (w/v) de collagénase de type 1 (Worthington) pendant 1h30 à 37°C sous agitation. Après filtration et centrifugation, le surnageant lipidique a été éliminé et le culot a été traité pendant 10 minutes avec un tampon de lyse des érythrocytes (ELB) puis centrifugé. Le tampon ELB était composé de 155 mM NH_4Cl (Sigma, Aldrich), 5.7 mM K_2HPO_4 (Sigma, Aldrich), K_2HPO_4 $3H_20$ (Sigma, Aldrich) et 0.1 mM EDTA (Sigma, Aldrich). Le culot a été resuspendu dans du milieu de culture (DMEM F12, Invitrogen) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau foetal (Lonza), puis filtré séquentiellement dans des filtres cellulaires de 100 µm , 70 µm et 40 µm (BD Falcon). Ensuite les cellules ont été ensemencées (10^3 or 20 x 10^3 cellules/cm²) et cultivées en atmosphère contrôlée (37°C, 5% CO2). Le milieu était changé tous les 3 jours.

L'isolation des cellules ADSC a été réalisée dans le laboratoire Inserm U577 par Reine Bareille, Charlotte Lalande et Robin Siadous.

5. Transfection des cellules pour le suivi par photon imageur

Luciférase

La transfection des cellules ADSC et MG63 par la luciférase a été réalisée grâce au lentivirus vecteur contenant le gène de la luciférase "firefly" sous le contrôle du promoteur MND (192). Pour la transfection virale, 2.10^5 cellules ont été mises au contact de 4.10^6 particules virales avec une MOI (Multiplicity of infection) de 20. Après 24 heures de culture, le milieu a été changé puis les cellules transfectées ont été amplifiées dans les mêmes conditions que précédemment.

La transfection des cellules par la luciférase a été réalisée dans le laboratoire Inserm U577 par Sofia Ziane.

GFP / Td Tomato

Pour la transfection des ADSC par la protéine GFP, le vecteur lentiviral contenant la protéine GFP était sous le contrôle du promoteur MND (192). Les cellules ADSC ont été transfectées après détachement de la boite de culture par la trypsine: 2.10^5 cellules ont été suspendues avec 8.10^6 particules virales (MOI=40). Après 24 heures, le milieu de culture a été changé puis il a été renouvelé tous les 2 jours pour permettre la prolifération cellulaire. Les cellules ont été observées sur un microscope à fluorescence (spectre d'excitation: 484 nm; spectre d'émission: 510 nm).

Pour la transfection des ADSC par la protéine td-Tomato, le vecteur lentiviral contenant la protéine td-Tomato était sous le contrôle du promoteur de la Phosphoglycérate kinase (PGK). Les cellules ADSC ont été transfectées après détachement de la boite de culture par la trypsine: 2.10^5 cellules ont été suspendues avec 6.10^6 particules virales (MOI=30). Après 24 heures, le milieu de culture a été changé puis il a été renouvelé tous les 2 jours pour permettre la prolifération cellulaire. Les cellules ont été observées sur un microscope à fluorescence (spectre d'excitation: 554 nm; spectre d'émission: 581 nm).

La transfection des cellules par le gène GFP et le gène Td Tomato a été réalisée dans le laboratoire Inserm U577 par Sofia Ziane.

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

1. COMMUNICATIONS ORALES

1. **Synthèse et caractérisation *in vivo* et *in vitro* d'hydroxyapatite nano cristalline.** **S Catros**, R Bareille, M Remy, S Perez, J Amédée, F Guillemot, JC Fricain. 25èmes Journées scientifiques du Collège Français de Biomatériaux Dentaires, Nice 26 et 27 Juin 08.
2. **High-throughput laser printing of cells and biomaterials for bone tissue engineering.** F Guillemot, **S Catros**, A Souquet, R Bareille, M Rémy, P Chabassier, JC Fricain, J Amédée. E-MRS Fall Meeting September 2008, Varsovie, Pologne.
3. **High-Throughput Biological Laser Printing of Nano-Hydroxyapatite and Human Osteo Progenitors.** **S Catros**, JC Fricain, B Guillotin, B Pippenger, R Bareille, J Amedee, F Guillemot. Congrès "Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux 2009", Bordeaux, 6-8 Juillet 2009.
4. **High-throughput Biological Laser Printing for Tissue Engineering.** F Guillemot, A Souquet, B Guillotin, **S Catros**, C Chollet, R Bareille, M Rémy, JC Fricain, MC Durrieu, J Amédée. 2nd TERMIS World Congress, Seoul, Republic of Korea, 31 Août-3 Septembre 2009.
5. **High-Throughput Biological Laser Printing For Bone Tissue Engineering.** **S Catros**, JC Fricain, B Guillotin, B Pippenger, R Bareille, J Amédée, F Guillemot. 2nd TERMIS World Congress, Seoul, Republic of Korea, 31 Août-3 Septembre 2009.
6. **Micro-impression laser d'hydroxyapatite nano-cristalline et d'ostéoblastes.** **S Catros**, JC Fricain, B Guillotin, B Pippenger, R Bareille, J Amédée, F Guillemot. Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, Clermont-Ferrand les 16-18 Septembre 2009.
7. **High-throughput Laser Printing of Cells and Biomaterials for Bone Tissue Engineering.** F Guillemot, A Souquet, B Guillotin, **S Catros**, R Bareille, M Rémy, JC Fricain, J Amédée. 2nd China-Europe symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine. 16-20 November 2009, Barcelona, Spain.
8. **Laser Assisted Bioprinting of Biomaterials & Cells: Jet Formation Modeling, Experimental Results and Perspectives in Tissue Engineering.** **S Catros**, A Souquet, B Guillotin, C Mézel, L Hallo, JC Fricain, F Guillemot. European Materials Research Society (EMRS) Strasbourg 7-11 Juin 2010.
9. **Laser Assisted Bioprinting of Cells & Biomaterials: Development of a Dedicated Workstation, Experimental Results and Jet Formation Modeling.** A Souquet, B Guillotin, **S Catros**, C Mézel, L Hallo, F Guillemot. 11th international symposium on Laser Precision Microfabrication (LPM), 7-10 Juin 2010, Stuttgart, Germany.
10. **Laser Assisted Bioprinting on PCL Electrospun Biopapers.** **S Catros**, S Ziane, A Nandakumar, B Guillotin, L Moroni, C Van Blitterswijk, O Chassande, B Rousseau, R Bareille, C Lalande, J Amédée, JC Fricain, F Guillemot. Termis Europe 13-17 Juin 2010, Galway, Irlande.
11. **Laser Assisted Bioprinting on PCL Electrospun Biopapers.** **S Catros**, S Ziane, A Nandakumar, B Guillotin, L Moroni, C Van Blitterswijk, O Chassande, B Rousseau, R Bareille, C Lalande, J Amédée, JC Fricain, F Guillemot. Biofabrication 2010,

Philadelphie, USA, 4-6 Octobre 2010.

12. **Laser-assisted Bioprinting: a New Tool for Microfabrication.** F Guillemot, A Souquet, B Guillotin, **S Catros**, A Fontaine, JC Fricain, J Amédée Biofabrication 2010, Philadelphie, USA, 4-6 Octobre 2010.

2. COMMUNICATIONS AFFICHÉES

1. **Micro-impression d'hydroxyapatite nano-cristalline par laser: étude chimique et biologique. S Catros**, R Bareille, J Amédée, JC Fricain, F Guillemot. 11e Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM). Nice 19-21 Mars 2009. ***Prix du meilleur poster.***
2. **LIFT Printing of nano-sized hydroxyapatite. S Catros**, JC Fricain, J Amédée, F Guillemot. Journée des jeunes chercheurs de l'Institut Européen de Chimie de Bordeaux (IECB), Pessac le 22 Mai 2008. ***Prix du meilleur poster.***
3. **Infra-Red (1064 nm) printing of nano-sized hydroxyapatite. S Catros,** JC Fricain, J Amédée, F Guillemot. Oral Poster conférence of Junior Euromat. Lausanne (Suisse) 14-18 Juillet 2008.
4. **Impression d'hydroxyapatite nano-cristalline par LIFT. S Catros**, JC Fricain, J Amédée, F Guillemot. 8e Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, Nantes 2-3 Octobre 2008.
5. **Impression d'éléments biologiques par LIFT: intérêt en ingénierie tissulaire osseuse. S Catros**, JC Fricain, F Guillemot. 54e congrès de la Société Francophone de Médecine Buccale et de Chirurgie Buccale (SFMBCB), Bordeaux, 14-16 Mai 2009.
6. **Infra-red (1064 nm) laser printing of biomaterials: preliminary results.** F Guillemot, A Souquet, **S Catros**, JC Fricain, R Bareille, MC Durrieu, J Amédée. 8th World Biomaterial Congress, Amsterdam, Pays-Bas 28 Mai-1er Juin 2008.
7. **In*vivo* High-Throughput Biological Laser Printing of Nano-Hydroxyapatite in Mice Calvaria Critical Sized Defect: Preliminary Results.**V Keriquel, **S Catros**, F Guillemot, JC Fricain. Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux 2009, Bordeaux, 6-8 Juillet 2009.
8. **Biological Laser Printing of nano-hydroxyapatite: chemical and biological study. S Catros**, R Bareille, J Amédée, JC Fricain and F Guillemot. European Society of Biomaterials (ESB), Lausanne, Suisse, 7-11 Septembre 2009.
9. **Laser Assisted Bioprinting (LAB) : application to living tissue fabrication.** B Guillotin, A Souquet, **S Catros,** B Pippenger, X Gauthereau, R Bareille, M Rémy, J Amédée, H Boeuf, F Guillemot. Congrès "Autour de la Cellule Souche", Bordeaux, 17-19 Mars 2010.
10. ***in vivo* Laser Assisted Bioprinting of Nano-Hydroxyapatite: Preliminary Results in Mice. S Catros**, V Keriquel, F Guillemot, JC Fricain. ITI World Congress, Genève, Suisse, 14-17 Avril 2010.
11. **Méthodes d'Imagerie *in vivo* sur le petit animal: intérêt en ingénierie tissulaire osseuse. S Catros**, S Ziane, C Lalande, I Arnault, B Rousseau, S Miraux, O Chassande, F Guillemot, JC Fricain. 56e Congrès de de la Société Francophone de Médecine buccale et Chirurgie buccale, Nîmes, 22 au 24 Avril 2010. ***Prix du Meilleur Poster.***

12. **Cell printing assisted by laser does not present a compromise between resolution and speed.** B Guillotin, A Souquet, **S Catros**, R Bareille, M Rémy, J Amédée, F Guillemot. Termis Europe 13-17 Juin 2010, Galway, Irlande.

3. PUBLICATIONS

1. **High-throughput Laser Printing of Cells and Biomaterials for Tissue Engineering.** F Guillemot, A Souquet, **S Catros**, J Lopez, M Faucon, B Pippenger, R Bareille, C Cholet, M Remy, P Chabassier, MC Durrieu, JC Fricain, J Amédée. *Acta Biomateriala*. 2010 Jul;6(7):2494-500. Epub 2009 Oct 9.

2. **Bioprinting for Computer and Robotic assisted medical intervention: preliminary results in mouse.** V Keriquel, F Guillemot, I Arnault, B Guillotin, S Miraux, J Amédée, JC Fricain, **S Catros.** *Biofabrication* 2010; 2: 014101 (8pp).

3. **Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters vs. cell fate, and perspectives in tissue engineering.** F Guillemot, A Souquet, **S Catros**, B Guillotin *Nanomedicine* (Lond) 2010 Apr;5(3):507-15.

4. **Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. S Catros**, F Guillemot, C Chanseau, E Laplaud, R Bareille, S Perez, J Amédée, JC Fricain. *IRBM* 2010; 31:226-233.

5. **Laser Assisted Bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization.** B Guillotin, A Souquet, **S Catros**, B Pippenger, S Bellance, R Bareille, M Rémy, J Amédée, F Guillemot. *Biomaterials* 2010, Oct;31(28):7250-6.

6. **Mise au point: Applications Cliniques de L'ingénierie Tissulaire Osseuse en Chirurgie Orale et Maxillofaciale. S Catros**, F Guillemot, J Amédée, JC Fricain. *Médecine Buccale, Chirurgie Buccale* 2010;16:227-237.

7. **Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting. S Catros**, M Bačáková, B Guillotin, JC Fricain, F Guillemot. *Applied Surface Science, accepté, sous presse.*

8. **Laser-Assisted Bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. S Catros,** JC Fricain, B Guillotin, B Pippenger, R Bareille, E Laplaud, B Desbats, J Amédée, F Guillemot. *Biofabrication, soumis.*

9. **La micro-impression d'éléments biologiques par laser: un nouvel outil pour l'ingénierie tissulaire. S Catros**, F Guillemot, J Amédée, JC Fricain *Revue de l'Association Dentaire Française (ADF)*, soumis

4. ACTES DE CONGRÈS

1. **High-Throughput Biological Laser Printing for Bone Tissue Engineering. S Catros,** JC Fricain, B Guillotin, B Pippenger, R Bareille, J Amédée, F Guillemot. *Tissue engineering and Regenerative Medicine*. 2009; 6(12): S48.
2. **High-Throughput Biological Laser Printing for Tissue Engineering.** F Guillemot, A Souquet, B Guillotin, **S Catros**, C Chollet, R Bareille, M Rémy, JC Fricain, MC Durrieu, J Amédée. *Tissue engineering and Regenerative Medicine*. 2009; 6(12): S43.

5. CHAPITRE D'OUVRAGE

High-throughput Laser Printing of Cells and Biomaterials for Tissue Engineering. F Guillemot, B Guillotin, **S Catros**, A Souquet, JC Fricain, J Amédée. Cell and Organ Printing (editors: Ringeisen, Bradley R.; Spargo, Barry J.; Wu, Peter K. (Eds.) Springer, 2010; 1st Edition., 2010, 300 p., Hardcover ISBN: 978-90-481-9144-4.

6. BREVET

Bioprinting station, assembly comprising such Bioprinting station and Bioprinting method. F Guillemot, V Keriquel, **S Catros**, JC Fricain. Brevet européen EP10305224.7 déposé le 4 mars 2010.

Les protocoles expérimentaux des études in vivo soumis au comité consultatif d'éthique ainsi que les articles, chapitre d'ouvrage et brevet sont présentés ci-après.

DOCUMENT DE SAISINE DU COMITE D'ETHIQUE SUR L'EXPERIMENTATION ANIMALE pour la Région Aquitaine et Poitou-Charentes

—

A remplir en ligne

L'analyse des informations contenues dans ce document sera effectuée dans la plus stricte confidentialité par l'ensemble du comité

Date de saisine : 28 Juillet 2009

Numéro d'enregistrement du projet :

Titre du projet : Utilisation d'un défaut osseux critique de calvaria chez la souris pour reconstruction osseuse *in situ* et *in vivo* par impression laser de biomatériaux.

INFORMATIONS CONCERNANT LE DEMANDEUR

Nom et Prénom : FRICAIN Jean-Christophe

Grade : PU/PH Odontologie Bordeaux

Organisme : Inserm

Laboratoire : Inserm U577, Biomatériaux et Réparation Tissulaire

Directeur : Joëlle Amédée

Equipe : Equipe A

Adresse : Université Victor Segalen Bordeaux 2 / Zone Nord, Bât 4A - case postale 45 / 146, rue Léo-Saignat / 33076 Bordeaux cedex

Téléphone : 05 57 57 14 88

Fax : 05 56 90 05 17

Adresse électronique : jean-christophe.fricain@biophys.u-bordeaux2.fr

Autorisation d'expérimenter sur vertébrés N° : 33 00048 Obtenue le 2 Aout 2004

Autorisation de pratiquer la chirurgie N° : R-13 CNRS – Chir 1-04 Obtenue le 19 Mai 2006

INFORMATIONS CONCERNANT LES LOCAUX D'EXPERIMENTATION

Agrément des locaux d'expérimentation N° : En cours d'Agrément (Locaux d'animalerie Conventionnelle Bordeaux 2)

Date : automne 2009

INFORMATIONS CONCERNANT LE PROTOCOLE ET LES ANIMAUX

Projet réalisé en collaboration avec d'autres équipes : NON

Du même laboratoire : NON

De laboratoires extérieurs : NON

- Intitulé du laboratoire :

- Adresse :

- Nom et grade du responsable impliqué :

But du protocole proposé :
Utiliser la méthode d'impression d'éléments biologiques par laser (HT Bio LP) pour reconstruire in vivo et in situ un défaut osseux en utilisant de l'hydroxyapatite nano-cristalline, des cellules osseuses et endothéliales, des facteurs de croissance (plasma riche en plaquettes), de la colle de fibrine et de la gélatine. L'intérêt de la technique est d'organiser les éléments de façon rapide, précise et reproductible grâce à une méthode d'impression par laser, directement sur l'animal vivant.

Si le protocole a déjà été mis en œuvre par d'autres laboratoires, veuillez justifier la répétition :
Ce protocole de reconstitution directe de tissu n'a jamais été expérimenté

Existe-t-il des méthodes alternatives pour réaliser ce travail : NON

Si OUI justifiez leur non-utilisation :

Espèces animales qui seront utilisées :

- espèce : souris OF-1
- sexe : Males et Femelles
- âge : 10 semaines
- poids : 25 g
- nombre : 50
- origine :
    * Propre élevage :
    * Fournisseur extérieur :
        -- Nom : Charles River
        -- Adresse : Domaine des oncins / BP 0109 / 69592 L'ARBRESLE Cedex

Justifiez le choix de l'espèce et le nombre d'animaux : La souche de souris choisie est réputée robuste et elle est peu coûteuse. Le nombre d'animaux choisi permettra d'effectuer plusieurs groupes tests et des témoins.

Date prévue pour le début de la mise en œuvre du protocole : Automne 2009

Date prévue pour la fin de l'expérimentation : Premier semestre 2010

Devenir des animaux en fin d'expérimentation : Sacrifice

Méthodes d'euthanasie prévues : Dislocation Cervicale

Description des procédures qui seront mises en œuvre sur les animaux :

1- Prélèvement de tissus après euthanasie :	q	
2- ~~Biopsies après anesthésie locale ou locorégionale~~ :	q	
3- ~~Prélèvement de sang~~ :		q
4- Etude du comportement :	q	
5- ~~Etude chronique~~ :	q	
~~- injection de drogues~~ :		q
- ~~greffe de tumeurs~~ :	q	
- ~~greffe d'organes~~ :	q	

~~- implantation d'électrodes~~ :	q	
- autre acte chirurgical :		q
- ~~inoculation d'agents infectieux~~ :	q	
- ~~manipulation du génome~~ :	q	
- ~~induction d'une maladie expérimentale~~ :	q	
- ~~essais de thérapie génique~~ :		q
~~- inoculation de substances radioactives~~ :	q	
- i~~mmunisation~~ :		q

6- Si une ou plusieurs cases ont été cochées en 5, veuillez compléter le questionnaire ci-dessous

~~Immunisation:~~

~~- protocole utilisé :~~

~~- utilisation d'adjuvant :~~

~~- fréquence des prélèvements sanguins :~~

~~- volumes prélevés :~~

Chirurgie :

- anesthésie (modalité - protocole) : Injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine et xylazine dans du NaCl.

- analgésie : Xylazine

- médication pré et post-opératoire : Sans

- condition d'observation et d'entretien des animaux opérés : Animalerie Conventionnelle

- expérimentation post opératoire :

Sacrifice à 1 semaine, 1 mois ou 3 mois

Méthodes d'analyse : Micro Scanner / Histologie Décalcifiée et Non Décalcifiée / Microscope Electronique à Balayage

Estimation de la souffrance :

~~q faible~~
q modérée
~~q importante~~
~~q sévère~~

Moyens mis en œuvre pour remédier à la souffrance :

Antalgiques

Critères d'arrêt par rapport à la souffrance :
Animaux immobiles, amorphes, poil hérissé.

Les données fournies dans ce document devront être complétées par un bref rapport donnant une vision explicite du projet de recherche :

Le projet de recherche s'inscrit dans le domaine de la reconstruction osseuse par ingénierie tissulaire. La méthode utilisées de transfert laser d'éléments biologiques permet d'organiser spatialement *in vitro* à l'échelle micrométrique plusieurs matériaux biologiques (ostéoblastes, cellules endothéliales, nano-hydroxyapatite). Cependant, le bien fondé et l'intérêt de cette organisation tissulaire n'a jamais été démontrée *in vivo.*
Cette expérimentation animale vise donc à étudier la reconstruction osseuse sur le modèle de défaut osseux critique de calvaria chez la souris en comparant deux méthodes : D'une part le matériau composite sera déposé de façon conventionnelle, sans organisation spatiale particulière ; d'autre part le même matériau sera organisé grâce à la technique d'impression d'éléments biologiques par laser directement dans le défaut.

Pour envoyer ce formulaire au Comité, merci de l'adresser par mél, en pièce attachée, à :

nathalie.aubailly@bordeaux.inserm.fr

NB : Pour les personnes qui utilisent Eudora sous Macintosh, merci d'adresser le formulaire au format " apple single ou mime "

En dernier recours, ce formulaire peut également être adressé sous forme papier à :
Madame Nathalie Aubailly
Animalerie Commune
Unité 862
Institut François Magendie
146, rue Léo Saignat
33077 Bordeaux Cedex

Informations concernant le demandeur

Laboratoire Intitulé	Inserm U577 "Biomatériaux et Réparation Tissulaire"
Directeur	Joëlle Amédée
Tel :	05 57 57 14 88

Demandeur et intervenant(s):

	Responsable de l'étude	Intervenant 1	Intervenant 2
Nom, prénom	FRICAIN Jean Christophe CATROS Sylvain	FRICAIN Jean Christophe	CATROS Sylvain X
Adresse	INSERM U577:Université Victor Segalen Bordeaux 2 Zone Nord, Bât 4A - case postale 45 146, rue Léo-Saignat 33076 Bordeaux cedex France		
Grade	PU-PH		
Téléphone	05 57 57 14 88		
Fax	05 56 90 05 17		
e-mail		jean-christophe.fricain@biophy	sylvaincatros@hotmail.com

		s.u-bordeaux2.fr	
N°autorisation d'expérimenter		33 00048	
N° autorisation de pratiquer la chirurgie			
N° certificat de capacité			

Collaboration :

Ce protocole s'effectue en collaboration avec une autre équipe : Non

Du même laboratoire Non

De laboratoire extérieur Non

Equipe Intitulé	
Personne responsable	
Tel :	
Mail :	
N° autorisation	
à expérimenter :	
à pratiquer la chirurgie	

Informations concernant les locaux d'expérimentation

Numéro d'agrément des locaux :.agrément des locaux en cours
Date :
Autorisation d'ouverture dans le cas d'animaux de la faune sauvage :

Informations concernant le protocole

But du protocole proposé : "Evaluer l'influence du mode d'organisation interne de matériaux composés de membranes de Polycaprolactone tissées par electrospinning et de cellules d'ostéosarcome humain transfectées par la luciférase (MG63-Luc) sur la prolifération cellulaire et la néo-formation osseuse, après implantation dans des défauts osseux bilatéraux sur la calvaria chez la souris NOG"

Si le protocole a déjà été mis en œuvre par d'autres laboratoires, veuillez justifier la répétition : Jamais mis en oeuvre

Existe t-il des méthodes alternatives pour réaliser ce travail : Non

Si oui justifiez de leur non utilisation :

Durée du projet :
Date prévue pour le début de la mise en œuvre du protocole : 15 Juin 2010

Date prévue pour la fin de l'expérimentation : 15 Aout 2010

Renseignement concernant les animaux :

Animaux utilisés	
Espèce	Souris Nog
Sexe	Males
Age	5 semaines
Poids	
Nombre	20
Origine	Elevage propre

Propre élevage	oui
Nom et adresse du fournisseur	
Autorisation d'importation	

Devenir des animaux en fin d'expérimentation : euthanasie

Méthodes d'euthanasie prévues : dislocation des vertèbres cervicales

Description des procédures qui seront mises en œuvre sur les animaux :

1- Prélèvement de tissus après euthanasie : oui: têtes
2- Biopsies après anesthésie locale ou locorégionale : non
3- Prélèvement de sang : non
4- Etude du comportement : non
5- Etude chronique :
- injection de drogues *: non
- greffe de tumeurs : non
- greffe d'organes : non
- implantation d'électrodes : non
- autre acte chirurgical : non
- inoculation d'agents infectieux : non
- manipulation du génome : non
- induction d'une maladie expérimentale : non
- essais de thérapie génique : non
- inoculation de substances radioactives : non
- immunisation : non
-Evaluation de la prolifération cellulaire par Photon-imageur 2 fois par semaine pendant la durée de l'expérimentation

Immunisation et chirurgie (partie à remplir que si vous avez coché des cases correspondantes dans la description des procédures ci-dessus)

Immunisation:

protocole utilisé :

utilisation d'adjuvant :

fréquence des prélèvements sanguins :

volumes prélevés :

Chirurgie :

ANESTHESIE			
Période Traitement	pré opératoire	opération	postopératoire
Produit		isofluorane	isofluorane
Mode d'administration		gaz inhalé	gaz inhalé
Dose / fréquence		1 seule chirurgie	2 fois / semaine

ANALGESIE			
Période Traitement	pré opératoire	opération	postopératoire
Produit			buprénorphine
Mode d'administration			SC
Dose / fréquence			1 injection

Médication pré et post-opératoire :

Condition d'observation et d'entretien des animaux opérés :

Estimation de la souffrance :

1- Faible : oui
2- Modérée : non
3- Importante : non
4- Sévère : non

Moyens mis en œuvre pour remédier à la souffrance :

- Surveillance du comportement des animaux après expérimentation

Critères d'arrêt par rapport à la souffrance :

Les critères d'arrêt du protocole sont ceux décrit par Montgomery, C.A. Jr. (1990), *Cancer Bulletin* 42:230-237and appeared in AWIC Newsletter, Spring 1995 6:4.

Nous retiendrons principalement comme critères :

- Volume tumoral supérieur à 2 cm^3
- Perte de poids supérieure à 20%
- comportement de l'animal : animal isolé par rapport au milieu extérieur, posture inhabituelle, piloérection

Informations concernant le demandeur

Laboratoire Intitulé	Inserm U577 "Biomatériaux et Réparation Tissulaire"
Directeur	Joëlle Amédée
Tel :	05 57 57 14 88

Demandeur et intervenant(s):

	Responsable de l'étude	Intervenant 1	Intervenant 2
Nom, prénom	FRICAIN Jean Christophe CATROS Sylvain	FRICAIN Jean Christophe	CATROS Sylvain X
Adresse	INSERM U577:Université Victor Segalen Bordeaux 2 Zone Nord, Bât 4A - case postale 45 146, rue Léo-Saignat 33076 Bordeaux cedex France		
Grade	PU-PH		
Téléphone	05 57 57 14 88		
Fax	05 56 90 05 17		
e-mail		jean-christophe.fricain@biophys.u-bordeaux2.fr	sylvaincatros@hotmail.com
N°autorisation d'expérimenter		33 00048	
N° autorisation de			

pratiquer la chirurgie			
N° certificat de capacité		??	

Collaboration :

Ce protocole s'effectue en collaboration avec une autre équipe : Non

Du même laboratoire Non

De laboratoire extérieur Non

Equipe Intitulé	
Personne responsable	
Tel :	
Mail :	
N° autorisation	
à expérimenter :	
à pratiquer la chirurgie	

Informations concernant les locaux d'expérimentation

Numéro d'agrément des locaux :.agrément des locaux en cours
Date :
Autorisation d'ouverture dans le cas d'animaux de la faune sauvage :

Informations concernant le protocole

But du protocole proposé : "Evaluer la prolifération de cellules dérivées de tissue adipeux humain transfectées par le gène de la luciférase (ADSC-Luc) et d'ostéoblastes de lignée humains (Ostéosarcome: MG63-Luc) après injection sous cutanée chez la souris NOG"

Si le protocole a déjà été mis en œuvre par d'autres laboratoires, veuillez justifier la répétition : Jamais mis en oeuvre

Existe t-il des méthodes alternatives pour réaliser ce travail : Non

Si oui justifiez de leur non utilisation :

Durée du projet :
Date prévue pour le début de la mise en œuvre du protocole : 3 Mai 2010

Date prévue pour la fin de l'expérimentation : 31 Mai 2010

Renseignement concernant les animaux :

Animaux utilisés	
Espèce	Souris Nog
Sexe	Males
Age	5 semaines
Poids	
Nombre	10
Origine	Elevage propre
Propre élevage	oui
Nom et adresse du fournisseur	
Autorisation d'importation	

Devenir des animaux en fin d'expérimentation : euthanasie

Méthodes d'euthanasie prévues : dislocation des vertèbres cervicales

Description des procédures qui seront mises en œuvre sur les animaux :

1- Prélèvement de tissus après euthanasie : ☒
2- Biopsies après anesthésie locale ou locorégionale : ☐
3- Prélèvement de sang : ☐
4- Etude du comportement : ☐
5- Etude chronique : ☐
- injection de drogues *: ☒
- greffe de tumeurs : ☒
- greffe d'organes : ☐
- implantation d'électrodes : ☐
- autre acte chirurgical : ☐
- inoculation d'agents infectieux : ☐
- manipulation du génome : ☐
- induction d'une maladie expérimentale : ☐
- essais de thérapie génique : ☐
- inoculation de substances radioactives : ☐
- immunisation : ☐

Immunisation et chirurgie (partie à remplir que si vous avez coché des cases correspondantes dans la description des procédures ci-dessus)

Immunisation:

- protocole utilisé :
- utilisation d'adjuvant :
- fréquence des prélèvements sanguins :
- volumes prélevés :

Chirurgie :

ANESTHESIE			
Période Traitement	pré opératoire	opération	postopératoire
Produit		isofluorane	isofluorane
Mode d'administration		gaz inhalé	gaz inhalé

Dose / fréquence		1 seule chirurgie	2 fois / semaine

ANALGESIE			
Période Traitement	pré opératoire	opération	postopératoire
Produit			
Mode d'administration			
Dose / fréquence			

Médication pré et post-opératoire :

Condition d'observation et d'entretien des animaux opérés :

Estimation de la souffrance :

1- Faible : ☒
2- Modérée : ☐
3- Importante : ☐
4- Sévère : ☐

Moyens mis en œuvre pour remédier à la souffrance :

- S'agissant d'une xenogreffe sous cutanée les textes de l'OVFS estime que la douleur est faible.

Critères d'arrêt par rapport à la souffrance :

Les critères d'arrêt du protocole sont ceux décrit par Montgomery, C.A. Jr. (1990), *Cancer Bulletin* 42:230-237and appeared in AWIC Newsletter, Spring 1995 6:4.

Nous retiendrons principalement comme critères :

- Volume tumoral supérieur à 2 cm^3
- Perte de poids supérieure à 20%
- comportement de l'animal : animal isolé par rapport au milieu extérieur, posture inhabituelle, piloérection

Acta Biomaterialia 6 (2010) 2494–2500

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actabiomat

High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering ☆

F. Guillemot [a,b,*], A. Souquet [a,b], S. Catros [a,b], B. Guillotin [a,b], J. Lopez [c], M. Faucon [c], B. Pippenger [a,b], R. Bareille [a,b], M. Rémy [a,b], S. Bellance [a,b], P. Chabassier [d], J.C. Fricain [a,b], J. Amédée [a,b]

[a] INSERM, U577, Bordeaux and Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR-S577, Bordeaux F-33076, France
[b] 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux Cedex, France
[c] ALPhANOV, Centre Technologique Optique et Lasers, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France
[d] Novalase SA, ZI de la Briqueterie, 6 impasse du Bois de la Grange, F-33610 Canejan, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 January 2009
Received in revised form 5 September 2009
Accepted 30 September 2009
Available online 9 October 2009

Keywords:
Bioprinting
Laser
Hydroxyapatite
Rapid prototyping

ABSTRACT

In parallel with ink-jet printing and bioplotting, biological laser printing (BioLP) using laser-induced forward transfer has emerged as an alternative method in the assembly and micropatterning of biomaterials and cells. This paper presents results of high-throughput laser printing of a biopolymer (sodium alginate), biomaterials (nano-sized hydroxyapatite (HA) synthesized by wet precipitation) and human endothelial cells (EA.hy926), thus demonstrating the interest in this technique for three-dimensional tissue construction. A rapid prototyping workstation equipped with an IR pulsed laser (τ = 30 ns, λ = 1064 nm, f = 1–100 kHz), galvanometric mirrors (scanning speed up to 2000 mm s^{-1}) and micrometric translation stages (x, y, z) was set up. The droplet generation process was controlled by monitoring laser fluence, focalization conditions and writing speed, to take into account its mechanism, which is driven mainly by bubble dynamics. Droplets 70 μm in diameter and containing around five to seven living cells per droplet were obtained, thereby minimizing the dead volume of the hydrogel that surrounds the cells. In addition to cell transfer, the potential of using high-throughput BioLP for creating well-defined nano-sized HA patterns is demonstrated. Finally, bioprinting efficiency criteria (speed, volume, resolution, integrability) for the purpose of tissue engineering are discussed.

© 2009 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tissue architecture is complex, characterized by multiple cell types and matrix components precisely organized in three dimensions. Loss of tissue architecture due to trauma or disease leads to loss of tissue function. Since the late 1980s and the creation of the first workable definition of hybrid artificial organs [1], an increasing number of research groups throughout the world have begun to develop various novel tissue engineering approaches. As stated by Langer and Vacanti [2], these approaches apply the principles of engineering and life sciences to the development of biological substitutes which restore, maintain or improve tissue function or a whole organ. In other words, generating biological tissues in vitro involves the use of engineering and material methods, the appropriate combination of cells and the suitable biochemical and physicochemical factors to mimic both the microenvironment of cells and the microarchitecture of tissues in the body.

The basic idea underlying classical tissue engineering has been that the seeding of living cells onto a biocompatible and eventually biodegradable scaffold followed by the culturing of this system in a bioreactor would lead to the initial cell population expanding into a tissue. With an appropriate scaffold which mimics the biological extracellular matrix, it is expected that the developing tissue will adopt both the form and function of the desired organ, and would then be implanted into the recipient. Tremendous investigations have been realized in the synthesis and manufacture of biomaterials in order to obtain highly biocompatible and functional scaffolds.

In parallel with these approaches, some authors have suggested the building of three-dimensional (3D) biological structures by the technology of bioprinting: the automated, computer-aided deposition of cells, cell aggregates and biomaterials [3,4]. To this end, commercially available inkjet printers have been successfully redesigned [5] or new ones built [6,7] to pattern biological assemblies according to a computer-aided design template. Pressure-operated mechanical extruders such as bioplotters have also been developed to handle live cells and cell aggregates [8].

☆ Research presented at the E-MRS 2008 Symposium on New Scaffolds for Tissue Engineering: Materials and Processing Methods, organized by Dr. W. Swieszkowski and Prof. D.W. Hutmacher.

* Corresponding author. Address: INSERM, U577, Bordeaux F-33076, France. Tel.: +33 557571727; fax: +33 556900517.
E-mail address: fabien.guillemot@inserm.fr (F. Guillemot).

1742-7061/$ - see front matter © 2009 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.actbio.2009.09.029

Parallel to these methods, laser-assisted printing technologies have emerged as an alternative method for the assembly and micropatterning of biomaterials and cells. Laser-guided direct writing (LGDW) is a technique capable of trapping multiple cells in a laser beam and depositing them as a steady stream onto arbitrary non-absorbing surfaces [10,11]. Biological laser printing (BioLP) is based on the laser-induced forward-transfer (LIFT) technique in which a pulsed laser is used to induce the transfer of material from a source film spread onto an optically transparent quartz support to a substrate in close proximity to or in contact with the film [12]. Depending on whether or not the material is embedded in a laser light-absorbing matrix, a thin sacrificial absorbing layer is necessary. Accordingly, processes have been called matrix assisted pulsed laser evaporation-direct write (MAPLE-DW) [13] or absorbing film assisted-LIFT (AFA-LIFT) [14]. As BioLP has proved more effective with the aid of the intermediate light-absorbing layer, MAPLE-DW has been abandoned. Under suitable irradiation conditions, and for liquids presenting a wide range of rheologies, the material can be deposited in the form of well-defined circular droplets with a high degree of spatial resolution [9,15].

Non-contact printing [16] is obtained through a jet formation which occurs, at a microsecond time scale, above a laser energy density threshold whose value depends on the rheological properties of liquid films and the thickness of the metallic absorbing layer [14]. By analogy with other studies in physics [17–19], it has been proposed that jet formation could be related to bubble dynamics [20]. Bubble growth depends mainly on viscosity and surface tension of the liquid, while bubble collapsing is related to the distance between the bubble front and the free surface [17]. Consequently, because droplet ejection is driven by bubble dynamics, high-throughput BioLP (HT-BioLP) requires spatial–temporal proximity between two pulses and, thus, two bubbles to be taken into account in order to avoid the perturbation of the collapsing of the initial bubble by another.

The present study develops a high-throughput workstation for printing different types of materials at micrometer resolution for the assembly of complex 3D biological structures. HT-BioLP parameters are first determined with regard to scanning or writing speed and bubble collapse-based mechanism. Then the potential of using BioLP to deposit a wide range of biological components was investigated, all of which are required for tissue engineering: biopolymers, nano-sized particles of HA as well as human endothelial cells. Finally, the potentiality of using HT-BioLP for tissue engineering is examined and discussed.

2. Materials and methods

2.1. Integration of a BioLP workstation

To design an efficient biological laser printer, various pulsed lasers were first considered to determine their suitability for working with living cells and biomaterials as well as for rapid prototyping applications. Major requirements considered included:

(i) The wavelength λ should not induce alteration of the biological materials used. In this aim, owing to the potential denaturation of DNA by UV lighting, near-IR lasers were preferred to UV lasers.
(ii) The pulse duration τ and the repetition rate f must be considered with the purpose of high throughput processes, unlike set-ups presented in previous studies on BioLP.
(iii) The beam quality, including divergence q, spatial mode and pulse-to-pulse stability (ptp) must be taken into account to ensure the reproducibility, the stability and the high resolution of the system.

A laser-based workstation dedicated to tissue engineering applications must be designed with the purpose of executing more processes than solely bioprinting (see Section 4). Consequently, the mean laser power should be high enough to perform additional processes such as micromachining, sintering, etc.

With regard to these criteria, a solid Nd:YAG crystal laser (Navigator I, Newport Spectra Physics) was selected with the following specifications (λ = 1064 nm, τ = 30 ns, f = 1–100 kHz, q = 3.4 mrad, TEM_{00}, ptp < 1.5% rms, P = 7 W).

A sophisticated five-axe positioning system was integrated into the workstation (NovaLase, SA, Canéjan, France) with the purpose of printing multi-color patterns and building 3D biostructures. The substrate was held with a (x, y, z) motorized micrometric translation stage whose resolution is 1 μm for the (x, y) axis and 5 μm for the z axis. In order to achieve multi-color printing, a high resolution (1° angular resolution) motorized carousel with a loading capacity of five different ribbons was designed (see Fig. 2). The substrate positioning system and carousel were held on the same vertical axis with the aim of varying focusing conditions without changing the gap distance.

Droplet generation from the ribbon surface was performed by driving the laser beam by means of a high speed scanning system composed of two galvanometric mirrors (SCANgine 14, ScanLab), with a scanning speed reaching 2000 mm s^{-1}, and a large field optical F-theta lens (S4LFT, Sill Optics, France) (F = 58 mm). Focal setting in the ribbon and (x, y, z) substrate positioning were carried out via a CCD camera through the optical scanning system. The integration of the laser and all above-mentioned components was made possible using Solidworks software. Substrate positioning, carousel driving, video observation and pattern designs were monitored with dedicated software developed with Delphi software.

Finally, this CAD/CAM workstation (Fig. 2) was placed in a cell culture room in order to facilitate cell transfer experiments.

2.2. Biomaterial and cell preparation

Sodium alginate (Protanal 10/60, FMC Biopolymer, Norway) solution was prepared at a 1% w/v concentration using deionized water or calcium- and magnesium-free phosphate-buffered saline.

Nano-HA was obtained by wet chemical precipitation, as described elsewhere [21]. Briefly, 100 ml of a 0.6 M solution of phosphoric acid (H_3PO_4, Prolabo, France) was added drop by drop in 100 ml of a 1 M solution of calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$, VWR, France) under vigorous stirring and with the pH being adjusted to 9 with sodium hydroxide at the end of the reaction. Whole characterization of as-synthesized nano-sized HA will be presented in another paper. The solution was left overnight at 4 °C to allow the nanoparticules to sediment at the bottom of the flask. Then, 50 ml of the supernatant were removed to obtain a 10% solution of nano-HA (average expected weight of nano-HA synthesis = 5 g).

The endothelial cell line EA.hy926 was cultured in Iscove modified Dulbecco's medium (IMDM, Gibco, Life Technologies, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Boehringer, Mannheim, Germany). After trypsinization and centrifugation, cells were suspended in 1% w/v sodium alginate solution (30–50 × 10^6 cells mL^{-1}).

2.3. Ribbon preparation

As described above, the ribbon is made of three layers: a support, a thin metal absorbing layer and a solution of hydrogel. The support is a 30 mm diameter disk made of IR-transparent quartz. This disk was sputter coated with 20–30 nm of gold using an Emscope SC500 coating unit. The thickness was chosen to be higher

than the optical skin depth (17 nm) at near-IR wavelengths (1064 nm). Then the hydrogel film, composed of a suspension of the desired materials, was spread onto the gold-coated quartz disk with a micrometric film blade (3570, Elcometer). Typical film thickness was 25 μm. All printing solutions or suspensions (alginate, nano-HA, cells) were prepared by adding 10% (v/v) of glycerol (Glycerol RP, Normapur, Prolabo, Paris, France) to the solution.

2.4. Determination of laser printing parameters

Printings were carried out by monitoring parameters such as scanning speed of galvanometric mirrors (in relation to laser frequency), laser fluence as well as gap distance between the ribbon and the substrate.

2.5. Substrate preparation

The printing elements were collected on a quartz disk, whose characteristics were the same as the support.

After printing of the EA.hy926 cells, the substrate was placed in a Petri dish with growth medium and incubated under traditional cell culture conditions.

2.6. Characterization of the transferred materials

Transferred droplets of nano-HA were observed by scanning electron microscopy (SEM) (Hitachi® S-2500 Tokyo, Japan) after gold sputtering at a 10 keV acceleration voltage.

Cell viability and mortality were determined with the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit, according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes).

3. Results

The first laser printing experiments were carried out using a sodium alginate (1% w/v) ribbon with a 700 μm gap distance and a 1.58 J cm^{-2} laser fluence. Micrometer droplets of alginate were difficult to distinguish by optical microscopy just a few minutes after printing. Only an annular shape could be observed (Fig. 3a). This phenomenon represents the characteristic "coffee-ring" effect, being the consequence of droplet evaporation on a surface. This issue was addressed by the addition of 10% glycerol in sodium alginate solution. Henceforth, spherical droplets became observable a sufficient amount of time after deposit for microscopy observation (see Fig. 3b).

In following with the above-mentioned mechanism for droplet ejection (see Fig. 1), vapor bubbles were observed above laser spots in the case of those experiments performed with viscous solutions (see Fig. 3c). In these latter conditions, no transfer was observable. In contrast, bubble bursting at the surface of the alginate 1% w/v film may be deduced from pictures of the ribbon taken after a 6 J cm^{-2} laser irradiation (see Fig. 3d). In addition, traces of film detachment were visible, notably around the laser spot. For intermediary laser fluences, as shown in Fig. 3a for printing performed at 1.58 J cm^{-2}, droplet sizes increased with laser fluence.

For a given alginate solution and at a defined repetition rate (for instance 5 kHz), the scanning speed of the galvanometric mirrors was adjusted from 700 to 150 mm s^{-1}. This led to the transition from a generation of isolated droplet microarrays to the creation of regular line patterns. These lines were obtained after the coalescence of droplets on the substrate.

Suspensions of 50 nm long, needle-shaped crystals of nano-HA (see Fig. 4a) were transferred onto a glass substrate. Droplets 50–80 μm in diameter were printed regularly in 5 mm^2 matrices and were observed by SEM (Fig. 4b). Increasing laser fluence applied to the ribbon (from 400 to 500 mJ cm^{-2}) led to increasing droplet diameters and the formation of irregular, splashed droplets (Fig. 4c), in the case of the highest fluences tested.

EA.hy926 endothelial cells embedded in a sodium alginate solution were printed at different laser fluences. Basic cell patterns consisting of droplet arrays with five to seven cells per droplet were first obtained (SS = 200 mm s^{-1} and F = 1.2 J cm^{-2}) (Fig. 5a). More complex patterns were then created thanks to the added computational capabilities of the CAD/CAM workstation. For instance, the number "577" (the Unit number of the laboratory containing the workstation) was high-speed written (in ~1 s) using endothelial cells. Subsequent viability assay using the live/dead procedure (Fig. 5b) exhibits the wide potentiality offered by this high-throughput laser printer in terms of cell patterning. Long-term viability tests also confirm the viability of printed cells after their incubation in serum-containing medium up to 11 days (Fig. 5c) after transfer.

4. Discussion

All these results confirm the excellent potential of HT-BioLP for the deposition of a wide range of biological components for use in biomaterial surface treatments as well as tissue engineering. Biopolymers, nano-sized particles and living cells have been positioned by this truly versatile bioprinting technology. Adjusting laser fluence has been necessary only in order to take into account the rheological properties of ribbons, such as viscosity and surface tension. For instance, HT-BioLP were performed at lower

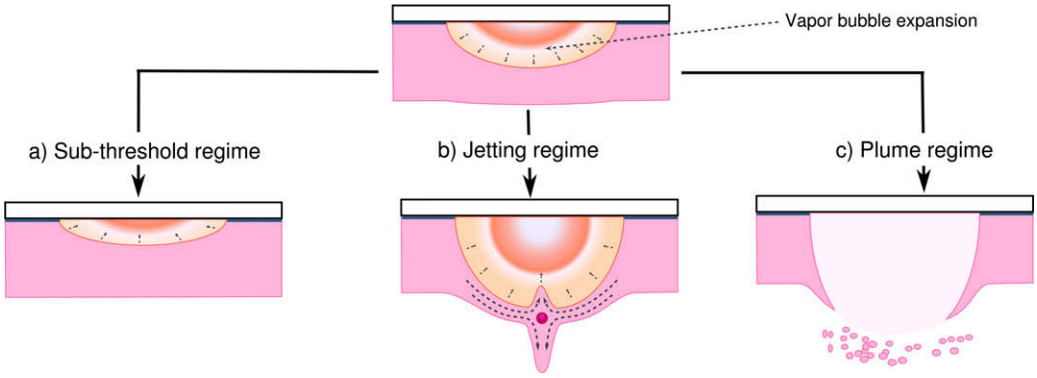


Fig. 1. Mechanism for laser-induced droplet ejection. A vapour bubble is generated by vaporization of the absorbing layer and/or the first molecular layers of the liquid film. At a given viscosity, depending on bubble dynamics, jetting (b) is observed for intermediary values of fluences. For lower fluences (a), the bubble collapses far from the free surface without generating a jet. For high fluences (c), the bubble bursts to the surface, generating sub-micrometer droplets. Increasing viscosity leads to increased threshold values between the subthreshold, jetting and plume regimes [31].

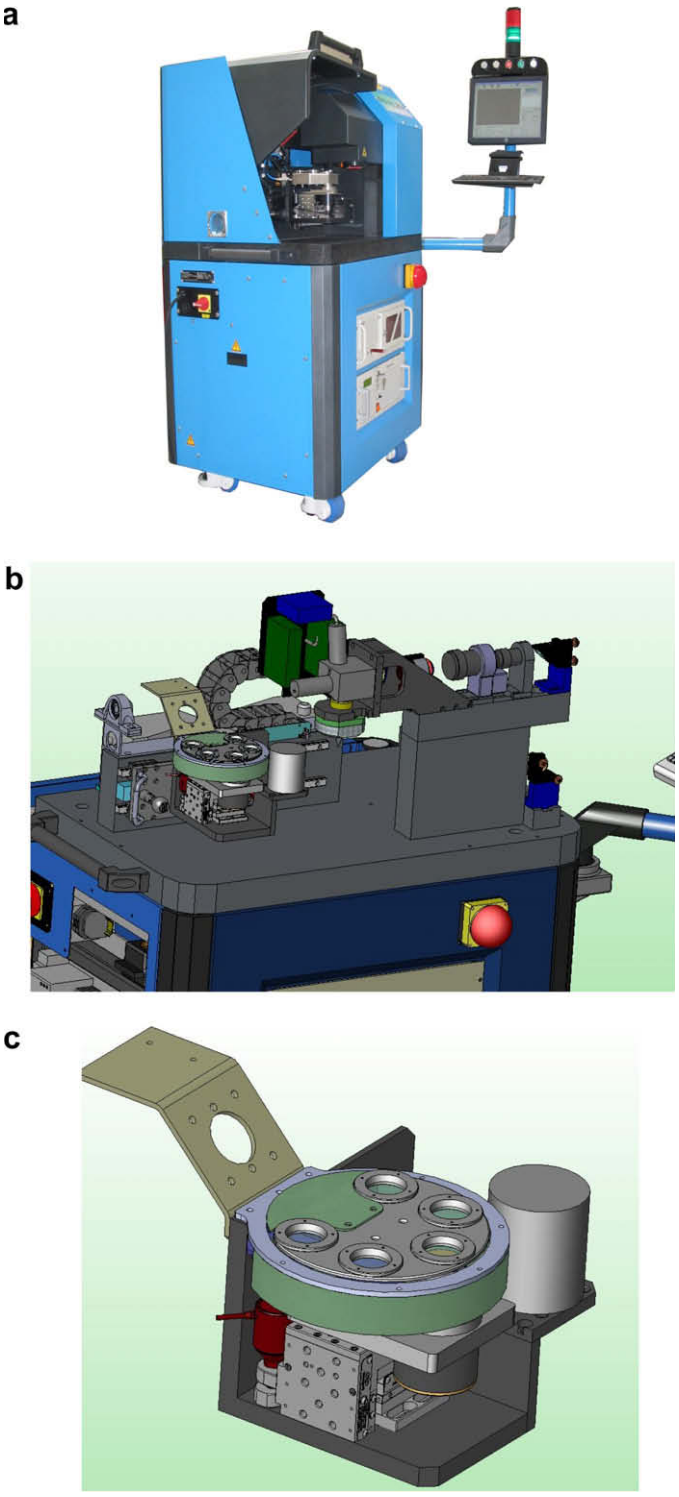


Fig. 2. (a) View of the high-throughput biological laser printer, (b) optomechanical set-up and (c) high resolution positioning system placed below the carousel holder with a loading capacity of five different ribbons.

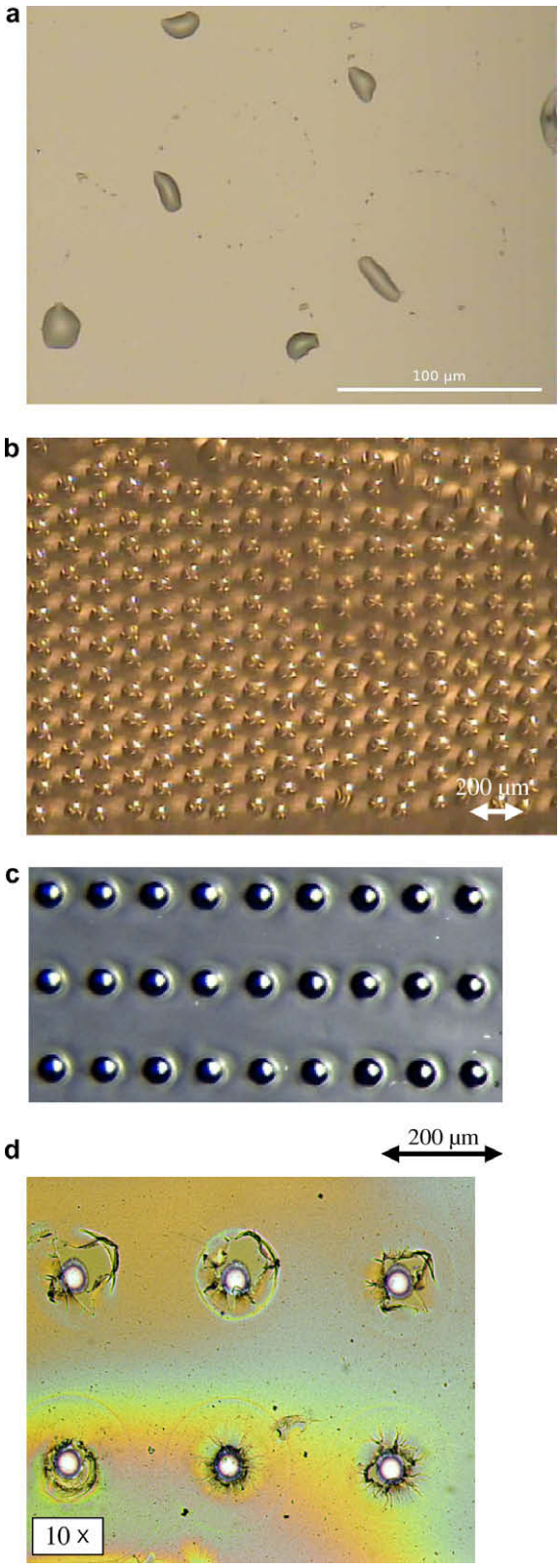


Fig. 3. Arrays of sodium alginate (1% w/v in water) droplets (a) without and (b) with 10% v/v glycerol (printing conditions were $f = 10$ kHz, $F = 1.58$ J cm^{-2}, $\Delta e = 800$ µm). (c) A similar experiment performed with a more viscous sodium alginate solution (2% w/v in water): ribbon exhibits bubbles above laser spots. (d) Bubble bursting at the surface of the alginate 1% w/v film after a 6 J cm^{-2} laser irradiation.

fluences in the case of nano-HA suspension than for sodium alginate 1% w/v.

In addition to its versatility, HT-BioLP is particularly favorable for cell printing. Compared with traditional laser printing experiments which use quite high glycerol concentrations [13,22], a low glycerol concentration was added to all suspensions to avoid ribbon dehydration as well as droplet evaporation on substrate. The reduction in the amount of glycerol was rendered possible owing to the short time involved in the printing process (a few sec-

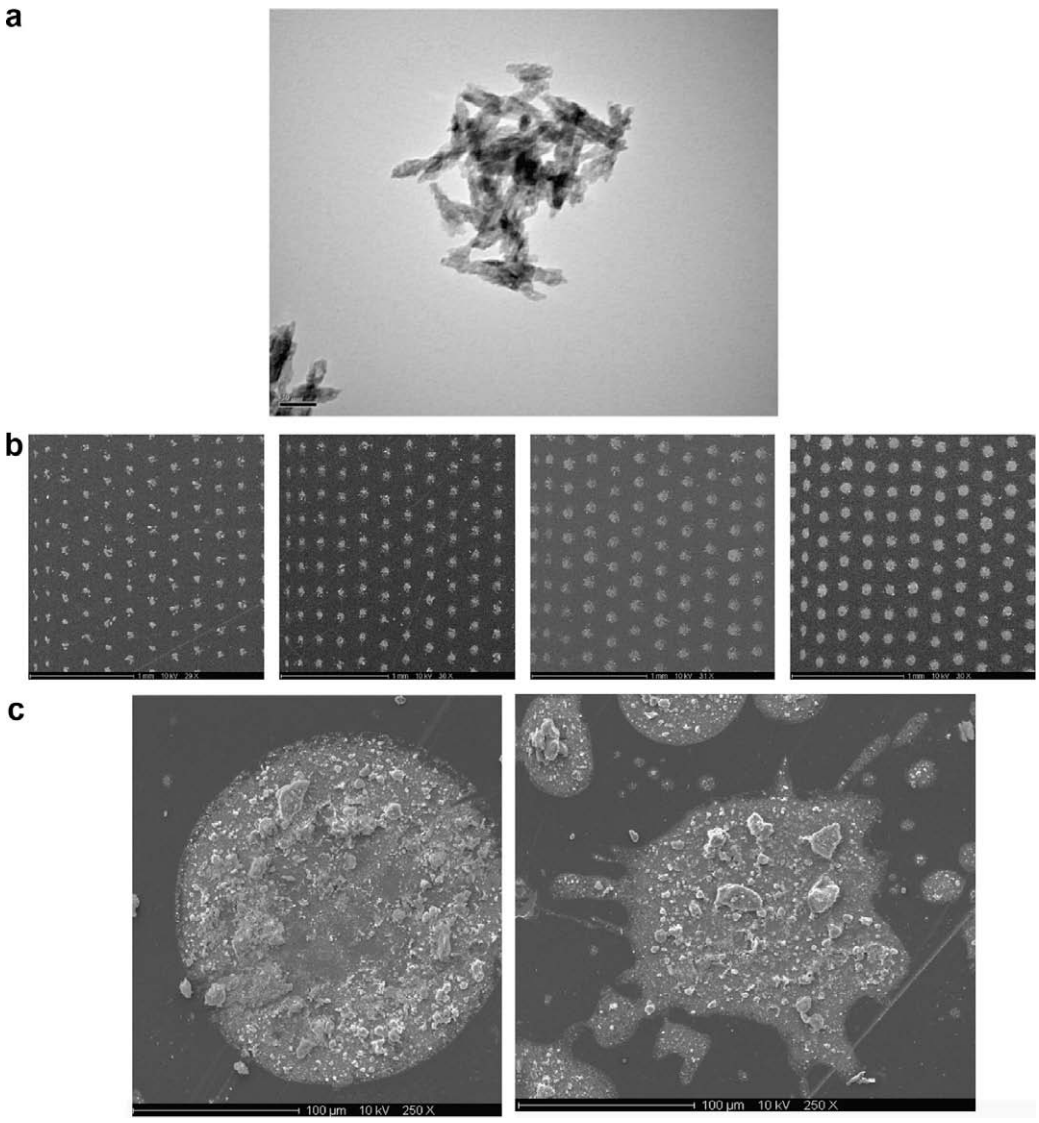


Fig. 4. (a) TEM observation of needle-shaped HA nanocrystals (average length 50 nm). (b) Modification of droplet size by increasing laser fluence. (c) High-resolution observation of nano-HA droplets of circular or irregular shape.

onds). In this way, the deleterious effects of placing cells in glycerol could be reduced, as MTT assays have shown that a glycerol content superior to 10% v/v presents a problem for cell viability. In the future, other additives such as methyl cellulose could be used to limit the deleterious effect of glycerol [23]. On a different but equally important note, unlike ink-jet printing, which attains only a low volume fraction of cells per droplet, it was shown that it is possible to transfer many cells per laser pulse. In the perspective of 3D tissue building, increasing the volume fraction of biological components within each matrix droplet is an essential issue. For studying cell–material interactions using Materiomics approaches [24], this component is also important.

Hypothesizing the inequity of bioprinting technologies with regard to cell fate and biomaterial properties, the definition of a bioprinting efficiency coefficient (BEC) which could also convey the biomanufacturing rate was proposed. The dimensional equation of biomanufacturing rate could be written as:

$$\mathrm{BEC} = \frac{L^3}{T} = \frac{L}{T} \times L^3 \times \frac{1}{L} \tag{1}$$

$$\mathrm{BEC} = \frac{\text{speed} \times \text{volume}}{\text{resolution}} \tag{2}$$

In Eq. (2), speed, volume and resolution could be defined as the bioprinter writing speed (m s^{-1}), the typical volume of cells or biomaterials deposited per droplet (μm^3) and the process resolution (µm), respectively. The higher the BEC, the more efficient the bioprinting process is for building 3D structures. Obviously, a high resolution criterion, which is required to position precisely cells, growth factors and other biomolecules, counterbalances the volume criterion.

In order to build 3D structures by means of bioprinting technologies, two methods can be used. These methods are based on (i) gelation of droplets [6,25] in contact with the surrounding media (for instance, droplets of alginate can be gelified when printing into a Ca^{2+} containing solution [6]), and (ii) use of biopapers onto which cells or biomaterials can be printed. The biopapers are then stacked one onto another to create a 3D structures [26]. To address volume and mechanical issues obtained by the 3D deposition of microdroplets of cells and biomaterials, 3D biostructures should preferentially be fabricated using biopapers. Consequently, the overall biofabrication process should proceed from a combination of processes and technologies interacting with bioprinting. Technologies such as fused deposition modelling [27], aerosols [28], electrospinning [29] as well as optically driven methods (such as photopoly-

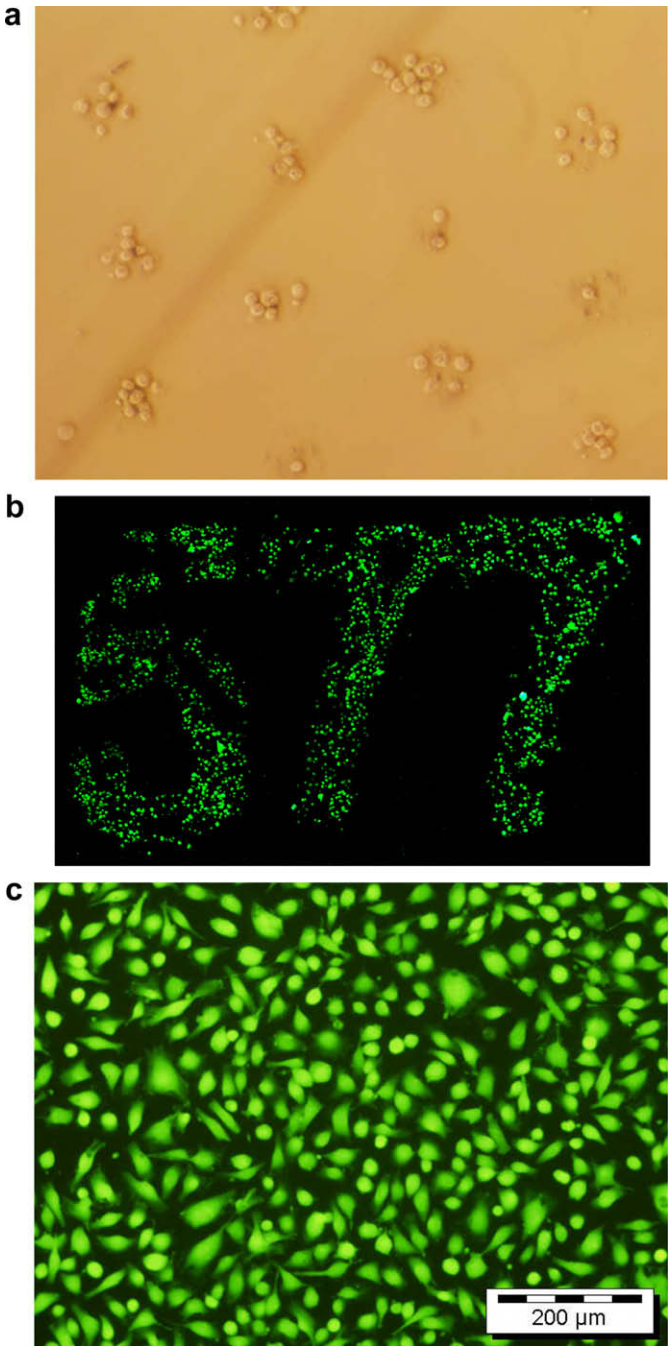


Fig. 5. (a) Laser printing of EA.hy926 endothelial cells featuring a concentration of five to seven cells per droplet. (b) 577 pattern with EA.hy926 cells after live/dead assay. (c) Observation of the substrate 11 days after the transfer after live/dead assay. In these experiments, laser fluence was 1.2 J cm^{-2}.

merizing, micromachining, laser catapulting [30], LGDW [10,11]) could thus be combined with bioprinting when the microarchitecture and the cell microenvironment of some tissue parts or layers do not require precise positioning of components. Consequently, a coefficient expressing the integrability or the interacting capacity of the bioprinting method has to be introduced in Eq. (2), leading to:

$$\mathrm{BEC} = \text{integrability} \times \frac{\text{speed} \times \text{volume}}{\text{resolution}} \quad (3)$$

Finally, as regards BEC rate and because a high-throughput biological laser printer could be easily combined with other laser-based processes, tissue engineering assisted by laser should become more important in the near future. This capacity of combining different optical monitored processes is indeed, in the authors' opinion, one of the major advantages of laser printing vs traditional bioprinting methods involving either thermal or piezoelectric inkjetting as well as pin depositing. In the future, such additional optical processes would include, but not be limited to, micromachining, cutting, photopolymerizing, sintering, etc.

5. Conclusions

After the development of a high-throughput biological laser printer, its potentiality for depositing a wide range of biological components was shown, all of which are required for tissue engineering: biopolymers, nano-sized particles of HA as well as human endothelial cells. These results emphasize the criteria that are required for building 3D structures through the bioprinting process: the writing speed, the volume fraction of deposited materials, the process resolution and its capacity to be combined with other tissue engineering methods. Future work will concern multi-color printing and building 3D biostructures.

Acknowledgements

The authors thank GIS "Advanced Materials in Aquitaine" and Région Aquitaine for financial support.

Appendix A. Figures with essential colour discrimination

Certain figures in this article, particularly Figures 2, 3 and 5, are difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the on-line version, at doi:10.1016/j.actbio.2009.09.029.

References

[1] Baquey C, Dupuy B. Hybrid artificial organs: concepts and development. Paris: Editions de l'Institut national de la sante et de la recherche medicale; 1989.
[2] Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. Science 1993;260:920–6.
[3] Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends Biotechnol 2003;21:157–61.
[4] Ringeisen BR, Othon CM, Barron JA, Young D, Spargo BJ. Jet-based methods to print living cells. Biotechnol J 2006;1:930–48.
[5] Boland T, Xu T, Damon B, Cui X. Application of inkjet printing to tissue engineering. Biotechnol J 2006;1:910–7.
[6] Makoto Nakamura, Akiko Kobayashi, Fumio Takagi, Akihiko Watanabe, Yuko Hiruma, Katsuhiro Ohuchi, Yasuhiko Iwasaki, Mikio Horie, Ikuo Morita, Setsuo Takatani, Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. Tissue Eng 2006.
[7] Saunders RE, Gough JE, Derby B. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. Biomaterials 2008;29:193–203.
[8] Jakab K, Norotte C, Damon B, Marga F, Neagu A, Besch-Williford CL, et al. Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. Tissue Eng A 2008;14:413–21.
[9] Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. Biomed Microdev 2004;6:139–47.
[10] Nahmias Y, Schwartz RE, Verfaillie CM, Odde DJ. Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. Biotechnol Bioeng 2005;92:129–36.
[11] Yaakov Nahmias, David J. Odde. Micropatterning of living cells by laser-guided direct writing: application to fabrication of hepatic–endothelial sinusoid-like structures. Nat Protoc 2006.
[12] Ringeisen BR, Kim H, Barron JA, Krizman DB, Chrisey DB, Jackman S, Auyeung RYC, Spargo BJ. Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells. Tissue Eng 2004;10:483–91.
[13] Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB. Application of laser printing to mammalian cells. Thin Solid Films 2004:383–7.
[14] Bela Hopp, Tomi Smausz, Norbert Kresz, Norbert Barna, Zsolt Bor, Lajos Kolozsvari, Douglas B. Chrisey, Andras Szabo, Antal Nogradi, Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. Tissue Eng 2006.
[15] Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR. Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. Ann Biomed Eng 2005;33:121–30.

[16] Duocastella M, Fernández-Pradas J, Serra P, Morenza J. Jet formation in the laser forward transfer of liquids. Appl Phys A: Mater Sci Process 2008;93:453–6.
[17] Pearson A, Cox E, Blake JR, Otto SR. Bubble interactions near a free surface. Eng Anal Boundary Elem 2004;28:295–313.
[18] Blake JR, Gibson DC. Growth and collapse of a vapour cavity near a free surface. J Fluid Mech Digital Arch 1981;111:123–40.
[19] Longuet-Higgins MS. Bubbles, breaking waves and hyperbolic jets at a free surface. J Fluid Mech Digital Arch 1983;127:103–21.
[20] Souquet A, Mézel C, Hallo L, Guillemot F, in preparation.
[21] Saeri MR, Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Sorrell CC. The wet precipitation process of hydroxyapatite. Mater Lett 2003;57:4064–9.
[22] Colina M, Serra P, Fernández-Pradas JM, Sevilla L, Morenza JL. DNA deposition through laser induced forward transfer. Biosens Bioelectron 2005;20:1638–42.
[23] Othon CM, Wu X, Anders JJ, Ringeisen BR. Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells. Biomed Mater 2008;3:034101.
[24] Truckenmüller R, Giselbrecht S, van Blitterswijk C, Dambrowsky N, Gottwald E, Mappes T, Rolletschek A, Saile V, Trautmann C, Weibezahn K, Welle A. Flexible fluidic microchips based on thermoformed and locally modified thin polymer films. Lab Chip 2008;8:1570–9.
[25] Boland T, Tao X, Damon BJ, Manley B, Kesari P, Jalota S, et al. Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs. Mater Sci Eng C 2007;27:372–6.
[26] Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. Biomaterials 2009;30:2164–74.
[27] Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. Biomaterials 2002;23:1169–85.
[28] Gagné L, Rivera G, Laroche G. Micropatterning with aerosols: application for biomaterials. Biomaterials 2006;27:5430–9.
[29] Prabhakaran MP, Venugopal J, Chyan TT, Hai LB, Chan CK, Tang ALY, Ramakrishna S. Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering. Tissue Eng A 2008.
[30] Vogel A, Lorenz K, Horneffer V, Huettmann G, von Smolinski D, Gebert A. Mechanisms of laser-induced dissection and transport of histologic specimens. Biophys J (2007) biophysj.106.102277.
[31] Young D, Auyeung RCY, Piqué A, Chrisey DB, Dlott DD. Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy. Appl Surf Sci 2002;197–198:181–7.

Biofabrication **2** (2010) 014101 (8pp) doi:10.1088/1758-5082/2/1/014101

In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice

Virginie Keriquel[1], Fabien Guillemot[1], Isabelle Arnault[1], Bertrand Guillotin[1], Sylvain Miraux[2,3], Joëlle Amédée[1], Jean-Christophe Fricain[1,4] and Sylvain Catros[1,4]

[1] INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France and Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR-S577 Bordeaux, F-33076 France
[2] Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536
[3] CNRS/Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146, rue Leo Saignat, F-33076 Bordeaux Cedex, France
[4] Dental School, University Victor Segalen Bordeaux 2, 16-20 Cours de La Marne, Bordeaux, F-33076 France

Received 1 October 2009
Accepted for publication 26 January 2010
Published 10 March 2010
Online at stacks.iop.org/BF/2/014101

Abstract
We present the first attempt to apply bioprinting technologies in the perspective of computer-assisted medical interventions. A workstation dedicated to high-throughput biological laser printing has been designed. Nano-hydroxyapatite (n-HA) was printed in the mouse calvaria defect model *in vivo*. Critical size bone defects were performed in OF-1 male mice calvaria with a 4 mm diameter trephine. Prior to laser printing experiments, the absence of inflammation due to laser irradiation onto mice dura mater was shown by means of magnetic resonance imaging. Procedures for *in vivo* bioprinting and results obtained using decalcified sections and x-ray microtomography are discussed. Although heterogeneous, these preliminary results demonstrate that *in vivo* bioprinting is possible. Bioprinting may prove to be helpful in the future for medical robotics and computer-assisted medical interventions.

(Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

1. Introduction

The development of computer-assisted medical interventions (CAMI) from the early 1980s results from converging evolutions in medicine, physics, materials, electronics, informatics, robotics, etc. As reported in [1] by Troccaz, CAMI aims at providing tools that allow the clinician to use multi-modality data in a rational and quantitative way in order to plan, to simulate and to execute mini-invasive medical interventions accurately and safely. Medical interventions include both diagnostic and therapeutic actions (surgery, radiotherapy, local injection of drugs, etc). To this aim informatics and micro-technology have accompanied the evolution of the clinical practice over the last decades and paved the way for robotic applications at the bedside. Indeed, thanks to CAMI (i) more and more data are handled for each patient (e.g. images, signals) during preparation and/or monitoring medical actions, (ii) traceability and quality control have been organized [2] and (iii) diagnostic and therapy procedures tend to be less and less invasive. Moreover, medical robotics have been improved by the development of automation [1, 3], which provides assistance to the clinician where his abilities (or presence) are limited. In medicine, as in many fields, the robot advantages come from precision, ability to repeat a task endlessly, potential connection to computerized data and sensors, or other capability to operate in hostile environments. From an operating point of view, potential specific robot abilities are for instance (i) to realize complex geometric tasks (e.g. to machine a 3D bone cavity), (ii) to be force-controllable down to very small force scales, (iii) to execute high resolution, high accuracy motions (for microsurgery), (iv) to track moving organs and

 © 2010 IOP Publishing Ltd Printed in the UK

to be synchronized to external events based on some signals and else (v) to be introduced in the patient for intra-body actions.

By the way, applications of rapid prototyping [4, 5] in regenerative medicine have been proposed thus allowing tissue engineers to precisely control the scaffold structure and hence guide cells to form a functional tissue [4]. More recently, technological advances in the fields of automation, miniaturization and computer-aided design and machining have led to the development of bioprinting, which has been defined as the 'computer-aided, automatic, layer-by-layer deposition, transfer and patterning of biologically relevant materials' [6, 7]. As compared to traditional approaches in tissue engineering [8], bioprinting represents a paradigm shift. Indeed, its principle is not so much to seed cells onto a macroporous and biocompatible scaffold but rather to organize the individual elements of the tissue during its fabrication step (before its maturation) through the layer-by-layer deposition of biological materials. To this aim, ink-jet bioprinters [9] have been successfully designed to pattern biological assemblies according to a computer-aided design template and pressure-operated mechanical extruders (bioplotters) have also been developed to handle living cells and cell aggregates [10].

Parallel to these methods, biological laser printing (BioLP) has been developed [11–13]. This latter method is based on the laser-induced forward-transfer (LIFT) technique in which a pulsed laser is focused onto an optically transparent quartz support coated by a source film (the ribbon) to propel material from this latter to a substrate. Non-contact printing is obtained through jet formation which occurs [14], at a microsecond time scale, above a complex threshold whose value depends on the rheological properties and the thickness of liquid films, the thickness of the metallic absorbing layer as well as laser energy [15, 16].

In this paper, we present the first attempt to apply bioprinting technologies in the perspective of computer-assisted medical interventions, e.g. bone repair. This proof of concept was performed using BioLP to deposit nano-hydroxyapatite (n-HA) into mouse calvaria defect of critical size, *in vivo*. For this purpose, a workstation dedicated to high-throughput biological laser printing was adapted to *in vivo* printing experiments. Procedures for *in vivo* printing are detailed and histological analysis of bioprinting-assisted bone repair (with decalcified sections and x-ray microtomography) is provided. Finally, on the basis of these results, new perspectives of bioprinting in the fields of computer-assisted medical interventions and *in vivo* tissue engineering are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of printable n-HA

Nano-hydroxyapatite (n-HA) slurry was prepared via wet chemical precipitation [17] at room temperature by dropping an orthophosphoric acid solution (H_3PO_4) into calcium hydroxide solution ($Ca(OH)_2$). TEM analysis of the dried synthesized material displayed 50 nm long needle-shaped crystals. FTIR analysis showed specific bands of phosphate ions at 559 cm^{-1}, 601 cm^{-1} and 1018 cm^{-1} and a non-specific carbonate band at 1415 cm^{-1} [18]. X-ray diffraction (XRD) analysis of dried material revealed crystallites with hexagonal lattice parameters specific of hydroxyapatite. For BioLP experiments, 30% (v/v) glycerol was added to the n-HA solution at the end of the preparation. Sterilization of the n-HA containing suspension was performed by UV irradiation during 15′. Biological properties of the powder material were previously tested *in vitro* and *in vivo*: it was shown that nHA synthesized was biocompatible with osteoblastic cells and caused no inflammation *in vivo* in mice calvarial defects [18].



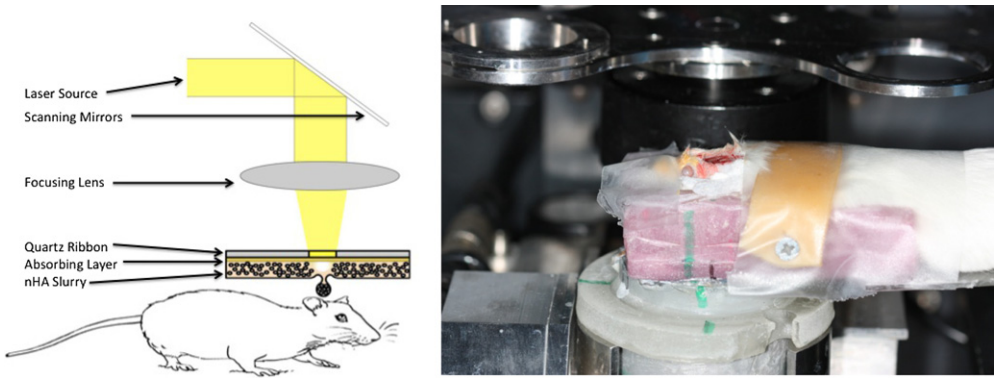
Figure 1. Critical size calvaria bone defects on the OF-1 male mouse.

2.2. Establishment of calvaria critical size defect in mice [19, 20]

Thirty-six 12 week old 0F-1 male mice (Charles Rivers, France) were used for this study: 6 were used to test infrared laser irradiation on mice brain and 30 were used for nHA *in vivo* printing. They were first anesthetized with Ketamin and Xylazine through intraperitoneal injection. After skin antisepsis (Betadine), an incision was performed in skull midline and the scalp was dissected to expose the calvaria, and then the periosteum was carefully peeled off. Two lateral 4 mm wide calvaria bone defects were performed (figure 1) in each animal with a 4 mm diameter trephine (TBR, Toulouse, France). One defect was used for laser processing while the contralateral site was untreated as negative control. The surgical procedures were performed under constant saline irrigation and care was taken to prevent dura mater injury. Then, the animals were placed inside the bioprinting workstation for *in vivo* printing experiments (see below). At the end of the experiment, the soft tissues were repositioned and sutured using 3/0 Vicryl. Animals recovered in a warm environment before being returned to animal facilities.

2.3. Ribbon preparation

For printing experiments, a 3 cm quartz blade was first coated with a thin absorbing layer of titanium (60 nm), using a high vacuum titanium coater. Then, 30 μl of the solution were spread on the ribbon surface by the help of a 'doctor blade'



(*a*) (*b*)

Figure 2. (*a*) Schematic set up for *in vivo* laser printing; (*b*) specific holder for *in vivo* printing in mouse calvaria defects.

device (Film Applicator 3570, Elcometer, France) to obtain a 30 μm thick layer of nHA slurry. More details on ribbon preparation and droplet ejection mechanism HT-Bio LP are presented in [15, 16, 21].

2.4. Adapting the HT-BioLP workstation for in vivo printing in mouse calvaria defects

A workstation dedicated to high-throughput biological laser printing has been set up for *in vivo* printing inside mouse calvaria defects. As described in [15], this workstation is composed of a solid Nd:YAG crystal laser (Navigator I, Newport Spectra Physics, $\lambda = 1064$ nm, $\tau = 30$ ns, $f =$ 1–100 kHz, $P = 7$ W) and a sophisticated five-axes positioning system. Droplet generation from the ribbon surface is usually performed by driving the laser beam by means of a high speed scanning system (up to 2000 mm s^{-1}) composed of two galvanometric mirrors (SCANgine 14, ScanLab) and a large field optical F-theta lens (S4LFT, Sill Optics, France) ($F = 58$ mm). Focal setting in the ribbon and (x, y, z) substrate positioning are carried out thanks to a CCD camera through the optical scanning system. Substrate positioning, carousel driving, video observation and pattern designs are computer-driven thanks to the dedicated software developed by Novalase S.A. (Canéjan, France).

For *in vivo* experiments, a specific mouse holder (figure 2) was implemented to this workstation. Particular attention was paid to the positioning of calvaria defects since they must face the ribbon. Consequently, the printing process was as follows:

- The mouse was placed into its holder, and then introduced inside the workstation onto (x, y, z) motorized translation stages.
- Thanks to the video system (i.e. CCD camera with an instantaneous display), the calvaria defects were visualized and focused by translating mouse holder according to the z-axis. Indeed, dura mater surface was recorded in the software as the position of the substrate following z-axis. This z-position was recorded as the physical position of the substrate into the software. The center of the right defect was then targeted through the touchscreen, inducing the translation of the mouse holder according to (x, y)-axes. This position is then recorded as the origin of the printed pattern.
- The pattern (a 3 mm diameter disk) was computed with the software and coupled with laser parameters (power, frequency), scanning speed and printing gap distance. In the framework of this study, in agreement with previous studies on laser printing of n-HA [15], the laser energy was 12 μJ per pulse (with a 40 μm spot size), the frequency was 5 kHz, the scanner speed was 200 mm s^{-1} and the printing gap was 1500 μm.
- 3D printing was performed by reproducing this pattern 30 times. Between each pattern, the holder was shifted automatically a given distance equal to the distance between two patterns printed onto the ribbon. Before any additional layer, the mouse holder was lowered 20 μm, which corresponds to the thickness of one n-HA layer.
- At the end of the process, the holder is lowered a suitable distance to avoid any contact between the mouse and the ribbon.

2.5. Effect of near infrared pulsed laser irradiation on the mouse brain

The effect of laser irradiation on mouse dura mater was evaluated prior to performing laser printing experiments. Critical size bone defects were realized on calvaria of six OF-1 male mice, and then animals were positioned inside the printing workstation and the laser was directly focused onto dura mater at one site. As the laser beam was directly focused on dura mater, the hypothetical deleterious effects on dura mater should be worse than those observed during nHA printing. Indeed, for nHA printing, the laser focus point was 1.5 mm above dura mater surface. The contralateral site was kept free of laser as negative control. Skin was sutured at the end of the experiment.

Inflammation was followed up longitudinally by magnetic resonance imaging (MRI) using a horizontal 4.7 T Biospec system (Bruker, Germany). This system is equipped with a 6 cm gradient insert capable of 950 mT m^{-1} maximum strength and 80 μm rise time. Mice were anesthetized with 1.5–2% isofluorane (Centravet, La Palisse, France) mixed in air and

then positioned prone within the magnet, with the head placed at the center of the NMR coil. The 3D images were performed with TrueFISP sequence: TE/TR = 3.2/6.4 ms, flip angle: 65°, FOV: 30 × 18 × 18 mm^2, matrix: 256 × 96 × 96, resolution: 117 × 188 × 188 μm^2, slice orientation: coronal, reception bandwidth: 195 Hz/pixel. The total number of averages was equal to 24 (6 per l magnitude images) resulting in a total acquisition time of 23 min 26 s [22].

Three animals were sacrificed after 1 week and the three remaining were sacrificed after 1 month via exposure to hyperbaric carbon dioxide. The skull and brain were harvested in blocks and prepared for demineralized histological sections. The samples were demineralized 12 h (Decalcifiant osseux BAYER, ref 70 033, France), dehydrated in ethanol (70%, 80%, 95%, 100%), and then embedded in paraffin. Ten microns coronal sections were cut and stained with hematoxylin–eosin–saffron (HES) and observed under a photomicroscope (Nikon eclipse 80i, The Netherlands). The sections were observed for the presence of inflammation at brain/skull interface.

2.6. In vivo printing of n-HA inside calvaria defects

Thirty OF1 male mice (12 weeks old) were included within this cohort. After the generation of calvaria bone defects, each animal received the same amount of material, which consisted in 30 stacked layers (20 μm each) of n-HA printed by HT Bio-LP in the left defect (test site). The contralateral (right) defect was left empty for negative control (control site). Skin was then sutured and animals were returned to animal facilities.

MRI was used as a non-invasive methodology to evaluate brain inflammation *in vivo* longitudinally in two animals of the 3 months group at day 7, day 15 and day 30. Parameters used in this study were similar to those presented above.

Regarding n-HA follow-up and new bone formation, mice were sacrificed after 1 week (mice number, $n = 10$), 1 month ($n = 10$) or 3 months ($n = 10$) via exposure to hyperbaric carbon dioxide and the entire heads were removed 'in block' and fixed 3 days in 4% PFA. X-ray microtomography acquisitions were done for all samples, using a general electric μCT. Tension and intensity used for x-ray generation were 80 kV and 60 mA respectively; 800 views were acquired with an exposure time of 3000 ms. The resolution obtained was 0.015 mm. Image J® Software was used to evaluate the unreconstructed surface of the bone defect. Statistical analysis was performed using Medcalc® software (Belgium). Comparisons of the three independent groups (unpaired samples: 1 week, 1 month and 3 months) were done with the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. Differences were considered significant with $p < 0.05$.

Finally, three samples of each group were demineralized for histology. Decalcified sections were prepared as described above, stained with hematoxylin–eosin–saffron (HES), and were observed under a photomicroscope (Nikon eclipse 80i, The Netherlands) for the presence of n-HA and newly formed bone.

3. Results and discussion

3.1. Rationale for printing n-HA in calvaria critical size defects created in living mice

The calvaria model of the critical size bone defect was retained since mice are small enough animals to be positioned easily inside our workstation. Adult mice (12 weeks old) were preferred to juvenile animals because of the absence of spontaneous bone healing in 3 mm wide calvaria defects [19, 20]. While the absence of mechanical loading applied to this bone defect model limits the extrapolation of results to long bone repair, this animal model was retained in order to evaluate *in vivo* bioprinting potentiality. In spite of the potentially traumatizing process, most of animals recovered rapidly and displayed no sign of infection or neurological disorders.

In vivo printing of n-HA was carried out using a HT Bio-LP workstation developed in the laboratory according to laser conditions described elsewhere [18]. Hydroxyapatite was chosen because it is the major non-organic component of bone and it has been involved in a large number of studies dealing with bone tissue engineering. In this study, the printing material was synthesized without resorting to any organic solvents and previous experiments have demonstrated that the material was not modified after printing [23].

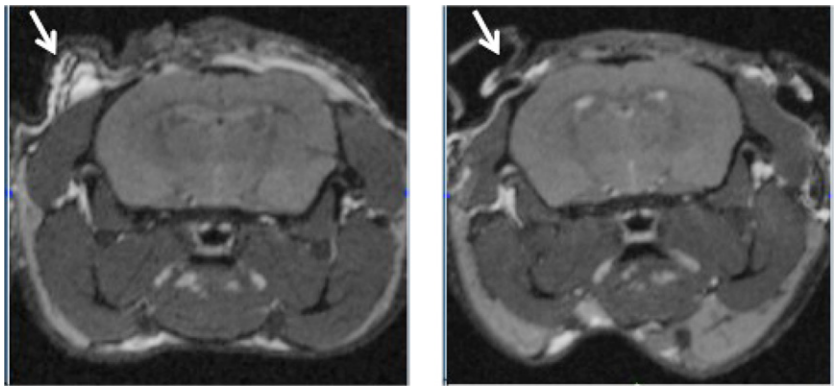
As a preliminary result, out of 30 male mice, 29 recovered after the whole process, including surgical sequence and further laser printing experiments. Neither wound infection nor neurological disorders developed in the animals after surgery and n-HA printing. In addition, after bone defect achievement, dura mater was checked for its integrity, which was confirmed by the presence of pulsating blood vessels.

3.2. Effect of near infrared laser irradiation on mice brain

While biological laser printing has been more largely studied using UV pulsed lasers at 248 nm and 355 nm [11, 24–26], a nanosecond pulsed laser emitting at 1064 nm was used due to the hypothesized innocuousness of near infrared laser pulses on biological tissues [27]. Direct laser irradiation was performed on dura mater of six mice, using a similar exposure as for printing experiments. As shown in figure 3, MRI analysis revealed that the laser effect and surgical trauma consisted in an edema beneath the dura mater on test side at day 7, which regressed at day 15 and disappeared after 21 days. Decalcified sections displayed myofibroblasts within both test and control defects, without inflammation or necrosis of nervous and bony tissues (figure 4). Based on these experiments, it was concluded that the infrared laser used in this experiment had no deleterious effects on the brain tissues studied.

3.3. In vivo n-HA printing inside calvaria defects and bone repair

Regarding printing of n-HA inside calvaria defects, macroscopic examination at the end of the experiment confirmed the presence of printed material according to the



(*a*) (*b*)

Figure 3. MRI displays an edema of dura mater on the irradiated side (arrow) after 1 week (*a*). After 2 weeks (*b*), the inflammation has regressed.

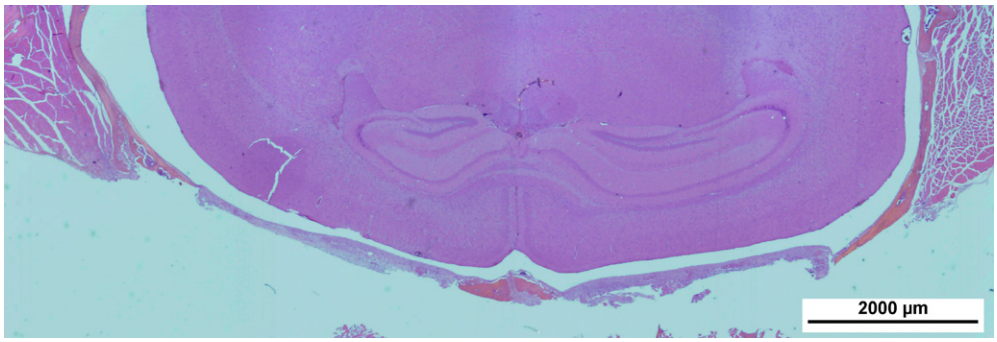


Figure 4. Decalcified coronal section of mouse brain, 15 days after surgery and laser irradiation. The inflammation has regressed and no necrosis is observable on brain tissues.

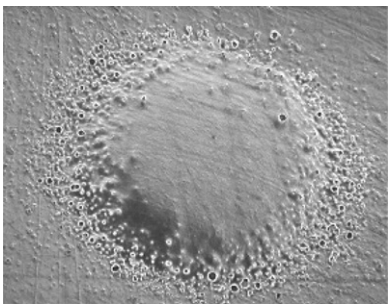


Figure 5. *In vitro* laser printing of 5 nHA stacked layers.

shape of the computer-drawn pattern. *In vitro* laser printing of five stacked layers of nHA onto the quartz slide is shown in figure 5.

Moreover, chemical and biological properties of the printed material were not modified by laser printing: previous studies performing x-ray diffraction and Fourier-transformed infrared spectroscopy on nano-hydroxyapatite powder displayed characteristic features of nHA, which were not modified after laser printing experiments [15, 18].

The follow-up of brain inflammation performed by MRI in animals with n-HA printing displayed the same inflammation intensity as the previous samples irradiated by laser (see above). Consequently, laser printing of n-HA *per se* does not provoke harmful effects on mice brain.

Longitudinal analysis of bone repair was done at three time points (ten mice after 1 week, ten mice after 1 month and ten mice after 3 months) based on decalcified histological sections and micro-computed tomography.

Decalcified sections revealed that the material was present in close contact with dura mater on the test sites after 1 week (figure 6(*a*)). After 1 month, newly formed mature and immature bones and n-HA aggregates inside macrophages were observed in test sites (figure 6(*c*)), while no bone repair was seen in control sites (figure 6(*d*)). Three months after printing, mature bone tissue was observed in test sites (figure 6(*e*), figure 7); in control sites (figure 6(*f*)) bone repair remained incomplete in many cases. In addition, from 1 week to 3 months, the amount of n-HA particles observed *in situ* decreased, probably because of integration of the material in bone remodeling or due to dissolution in the interstitial fluids and phagocytosis by inflammatory cells [28].

These results were confirmed through x-ray micro-tomography analyses and revealed heterogeneous reconstruction from one sample to another in test sites (right sides). In some cases, bone formation was clearly observed 1 month after printing while other bone defects appeared almost empty after 3 months (figure 8). Hence, statistical analysis of bone formation by means of x-ray micro-tomography images revealed that bone repair on test sites was not significantly higher than on control sites. Nevertheless, it was possible to conclude that unreconstructed

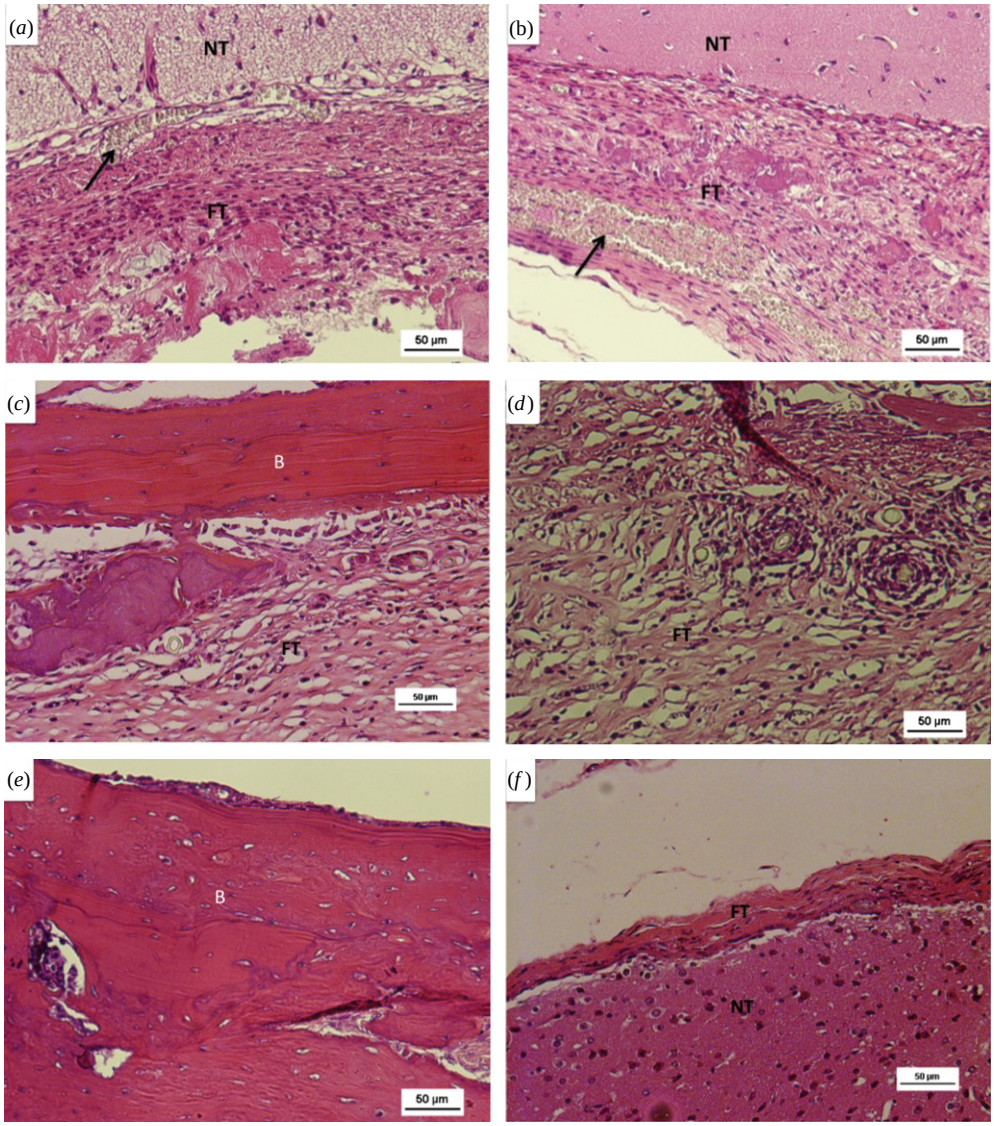


Figure 6. Decalcified histology of mouse calvaria after 1 week (*a*–*b*), 1 month (*c*–*d*) and 3 months (*e*–*f*) of healing. (*a*) Test site, 1 week: laser printed n-HA (arrow) in close contact with the brain surface. (*b*) Control site, 1 week: some n-HA (arrow) is seen at distance from brain surface. (*c*) Test site, 1 month: mature and immature bones are observed. (*d*) Control site, 1 month: fibrous tissues are present in the defect. (*e*) Test site, 3 months: mature bone tissue repaired the entire defect in this case. (*f*) Control site, 3 months: no bone tissue is present in the center of the defect. (B: bone; NT: nervous tissues; FT: fibrous tissues).

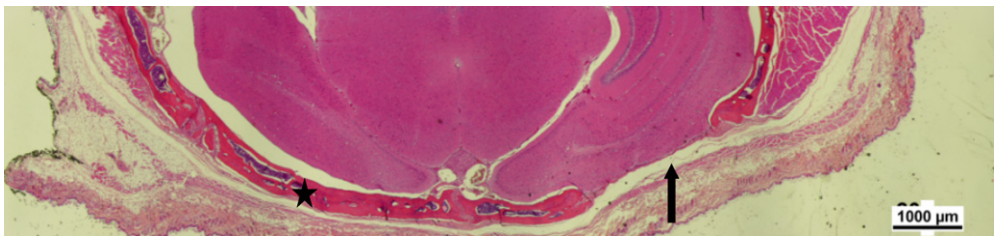
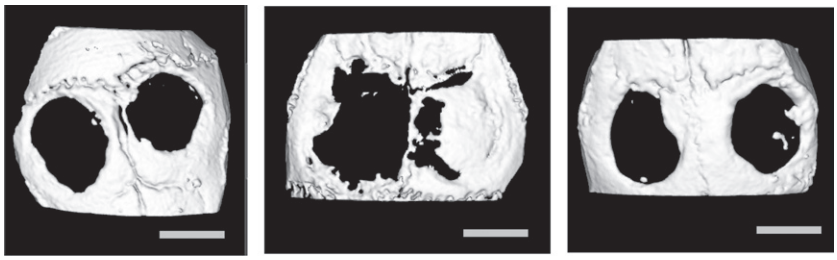


Figure 7. Complete bone repair on the test side was observed in one sample after 3 months (star). The bone defect control site is not reconstructed in this picture (arrow).

surfaces were significantly lower at 1 month versus 1 week ($p < 0.05$), significantly lower at 3 months versus 1 month ($p < 0.01$) and significantly lower at 3 months versus 1 week ($p < 0.01$). It may be due to natural bone repair. Furthermore, no bone formation occurred in negative control sites at any time.

Regarding the heterogeneous effect on bone formation, some surgical steps seem critical. Indeed, in some cases,



(*a*) (*b*) (*c*)

Figure 8. X-ray micro-tomography images obtained 1 week (*a*), 1 month (*b*) and 3 months (*c*) after n-HA printing. Scale bar represents 3 mm.

n-Ha material was also observed in the contralateral defect, an area not affected by the printing experiment. As shown in figure 6(*b*), n-HA can be observed at a distance from the brain surface (control sites, calvaria midline). These n-HA particles may have moved from the printed site due to the absence of immobilization of printed materials into the recipient site. Pressures applied on the skin during suturing and after animal recovery could have thus induced migration of printed n-Ha from the printed defect to the contralateral site. Hence, qualitative bone repair on decalcified sections and quantitative analysis using x-ray microtomography images revealed inconsistent reconstruction of the defects on test and control sites. In the future, specific attention will be paid to immobilizing the printed materials and in suturing mouse skin. To this aim, using surgical glue or other biomembranes is envisaged.

4. Conclusions and perspectives

Despite heterogeneous effects on bone formation, *in vivo* bioprinting of nano-hydroxyapatite has been performed by means of a CAD-CAM workstation dedicated to high-throughput biological laser printing. Although preliminary, these results demonstrate that *in vivo printing* is possible and may prove to be helpful in the future for medical robotics and computer-assisted medical interventions.

Upgrading medical robots with bioprinting ability may allow us, first, to improve surgical precision. Indeed, while μL volumes of materials or drugs can be currently handled in the body by surgeons (or actual robots) by using syringes, much smaller volumes could be deposited using bioprinters since these later can generate droplets of pL volume. Moreover, parallel to volume reduction, spatial resolution will also be largely improved by the use of laser printers or other bioprinters.

Finally, whether *in vivo* bioprinting appears as an original application of laser technologies, combination of laser printing with other laser-assisted processes (e.g. laser tissue ablation, laser heating, etc) could offer new perspectives to robot manufacturers and hence, clinicians.

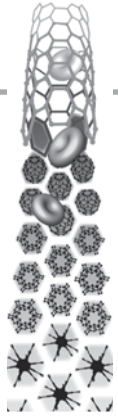
Acknowledgments

This paper is dedicated to the memory of Dr Laurent Pothuaud who actively contributed to the development of x-ray microtomography and image analysis in our research center. Moreover, the authors would thank the scientific cluster 'Advanced Materials in Aquitaine' and the Aquitaine region for financial support.

References

[1] Nof S Y 2009 *Springer Handbook of Automation* (Berlin: Springer)
[2] Cinquin P, Troccaz J, Champleboux G and Lavallee S 2004 SURGETICA at Grenoble: from computer assisted medical interventions to quality inspired surgery *Stud. Health Technol. Inform.* **100** 117–29
[3] Taylor R 2006 A perspective on medical robotics *Proc. IEEE* **94** 1652–64
[4] Hutmacher D W 2000 Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage *Biomaterials* **21** 2529–43
[5] Bártolo P J, Almeida H A, Rezende R A, Laoui T and Bidanda B 2008 Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering *Virtual Prototyping Bio Manuf. Med. Appl.* 149–70
[6] Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G and Markwald R R 2003 Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering *Trends Biotechnol.* **21** 157–61
[7] Mironov V, Trusk T, Kasyanov V, Little S, Swaja R and Markwald R 2009 Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm *Biofabrication* **1** 022001
[8] Langer R and Vacanti J P 1993 Tissue engineering *Science* **260** 920–6
[9] Boland T, Xu T, Damon B and Cui X 2006 Application of inkjet printing to tissue engineering *Biotechnol. J.* **1** 910–7
[10] Jakab K *et al* 2008 Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures *Tissue Eng.* A **14** 413–21
[11] Barron J A, Ringeisen B R, Kim H, Spargo B J and Chrisey D B 2004 Application of laser printing to mammalian cells *Thin Solid Films* **453–4** 383–7
[12] Ringeisen B R, Othon C M, Barron J A, Young D and Spargo B J 2006 Jet-based methods to print living cells *Biotechnol. J.* **1** 930–48
[13] Dinca V, Ranella A, Farsari M, Kafetzopoulos D, Dinescu M, Popescu A and Fotakis C 2008 Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer *Biomed. Microdevices* **10** 719–25
[14] Duocastella M, Fernandez-Paras J, Serra P and Morenza J 2008 Jet formation in the laser forward transfer of liquids *Appl. Phys.* A **93** 453–6
[15] Guillemot F *et al* 2009 High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering *Acta Biomater.* in press doi:10.1016/j.actbio.2009.09.029
[16] Mézel C, Hallo L, Souquet A, Guillemot F and Breil J Self-consistent modeling of a LIFT process in the nanosecond laser pulse regime *Phys. Plasma* **16** 123112–6

[17] Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri M R and Sorrell C C 2003 Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite *Mater. Design* **24** 197–202
[18] Catros S, Guillemot F, Chanseau C, Laplaud E, Perez S, Bareille R, Amédée J and Fricain J 2010 Chemical properties, *in vitro* and *in vivo* characterization of nano-sized hydroxyapatite synthesized at low temperature *IRBM Biomed. Eng. Res.* under review
[19] Aalami O O, Nacamuli R P, Lenton K A, Cowan C M, Fang T D, Fong K D, Shi Y, Song H M, Sahar D E and Longaker M T 2004 Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults *Plastic Reconstr. Surg.* **114** 713–20
[20] Gupta D M, Kwan M D, Slater B J, Wan D C and Longaker M T 2008 Applications of an athymic nude mouse model of nonhealing critical-sized calvarial defects *J. Craniofac. Surg.* **19** 192–7
[21] Mézel C, Souquet A, Hallo L and Guillemot F 2010 Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: jet formation modeling *Biofabrication* **2** 014103
[22] Miraux S, Massot P, Ribot E J, Franconi J and Thiaudiere E 2008 3D TrueFISP imaging of mouse brain at 4.7 T and 9.4 T *J. Magn. Reson. Imaging* **28** 497–503
[23] Catros S, Fricain J, Guillotin B, Pippenger B, Bareille R, Laplaud E, Desbats B, Amédée J and Guillemot F 2010 High-throughput laser printing of nano hydroxyapatite and human osteoblasts for bone tissue engineering *Biomaterials* submitted
[24] Duocastella M, Fernández-Pradas J M, Serra P and Morenza J L 2008 Laser-induced forward transfer of liquids for miniaturized biosensors preparation *J. Laser Micro/Nanoeng.* **3** 1–4
[25] Hopp B, Smausz T, Kresz N, Barna N, Bor Z, Kolozsvári L, Chrisey D B, Szabó A and Nógrádi A 2005 Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer *Tissue Eng.* **11** 1817–23
[26] Ringeisen B R, Kim H, Barron J A, Krizman D B, Chrisey D B, Jackman S, Auyeung R Y and Spargo B J 2004 Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells *Tissue Eng.* **10** 483–91
[27] Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca J, Carle G F and Rochet N 2009 Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts *Lasers Surg. Med.* **41** 291–7
[28] Kwong C H, Burns W B and Cheung H S 1989 Solubilization of hydroxyapatite crystals by murine bone cells, macrophages and fibroblasts *Biomaterials* **10** 579–84



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

Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering

We describe the physical parameters involved in laser-assisted cell printing and present evidence that this technology is coming of age. Finally we discuss how this high-throughput, high-resolution technique may help in reproducing local cell microenvironments, and thereby create functional tissue-engineered 3D constructs.

KEYWORDS: bioprinting ■ cells ■ modeling ■ rapid prototyping ■ tissue engineering

Fabien Guillemot†, Agnès Souquet, Sylvain Catros & Bertrand Guillotin

†Author for correspondence: INSERM, U577, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, F-33076 France
Tel.: +33 557 571 727
Fax: +33 556 900 517
fabien.guillemot@inserm.fr

On tissue engineering approaches

The loss or failure of an organ or tissue is one of the most frequent, devastating and costly problems in healthcare [1]. Current treatment modalities include transplantation of organs, surgical reconstruction, use of mechanical devices or supplementation of metabolic products. Epidemiological studies highlight tissue/organ shortage, which justifies original approaches to fulfill clinical needs [2]. Tissue engineering (TE) aims at providing regenerative medicine with original products. In addition, TE may provide original models (2D/3D) for fundamental research in biology [3]. Since the late 1980s and the creation of the first workable definition of hybrid artificial organs [4], an increasing number of research groups throughout the world have developed TE-orientated approaches. As stated by Langer and Vacanti [5], these approaches apply the principles of engineering and life sciences to the development of biological substitutes that restore, maintain or improve tissue or whole organ function. Generating biological tissues *in vitro* involves the use of engineering and material methods, the appropriate combination of cells and the suitable biochemical and physicochemical factors to mimic both the microenvironment of cells and the microarchitecture of tissues in the body. Traditionally, TE approaches use porous biomaterial scaffolds seeded with isolated autologous cells from the patient, culturing the constructs in a bioreactor and implanting the resulting cell/biomaterial complex back into the patient. With an appropriate scaffold that mimics the biological extracellular matrix, it is expected that the developing tissue will adopt both the form and function of the desired organ. Tremendous progress in the synthesis and manufacturing of biomaterials in order to obtain highly biocompatible and functional scaffolds has been made.

Tissue engineering has already proven its ability to move from the bench to the bedside [6]. For instance, blood vessel-, skin-, cornea- and bladder-related TE products have been successfully translated from research to clinical practice [7–11].

Despite these scientific progresses and clinical outcomes, engineered tissues and especially thick or complex tissues still suffer from reoccurring drawbacks:

- Cell penetration and adhesion is not very effective. One or several months may be required for the cells to adhere and proliferate into the scaffold. As a result, an incomplete colonization, limited to the scaffold's external layers, may occur [12];
- Organs and tissues are generally complex, and host different cell types. Cell-to-cell contact and cell-to-substrate interaction is critically involved in tissue morphogenesis and regulation, or healing. Consequently the need to promote cell-to-cell communication remains a very challenging issue for this kind of approach;
- The absence of built-in vascularization [12,13]. Most tissues in the body rely on blood vessels to supply individual cells with nutrients and oxygen. For a tissue thickness beyond 100–200 µm (the diffusion limit of oxygen), new blood-vessel formation is required, and this holds true for TE constructs [14].

The limitations of the scaffold-based TE lie in the initial paradigm of creating a functional 3D tissue structure by seeding cells (differentiated or stem cells) onto the scaffold, without any *ab initio* patterns. In other words, the question

future medicine part of fsg

of "what 3D pattern of cells and biomaterials must be fabricated?" has been consistently either eluded to or ignored, probably because no relevant technology has previously existed. This question, which is similar to Rivron's "How to orchestrate developmental mechanisms *in vitro*?" [15] is now a leading concern and should become the focus of studies in the future.

In this report we discuss the need to develop tools dealing with tissue complexity and anisotropy, and physical parameters involved in laser-assisted cell printing. We then present evidence that this technology is coming of age. Finally we discuss how high-throughput, high-resolution techniques may address these questions in the near future.

From macroscopic to microscopic TE

Stem cell fate is influenced by a number of factors and interactions that require robust control for safe and effective regeneration of functional tissue [16]. Coordinated interactions with soluble factors, other cell types and extracellular matrices define a local biochemical and mechanical microenvironment with complex and dynamic regulation that stem cells sense [15]. On a local scale, tissue development is, in part, regulated by the spatial and temporal distribution of cues (i.e., local gradients of soluble or insoluble factors, local physical forces). This suggests a dynamic interaction between form and function [17,18] and emphasizes the importance of shaping adequate multicellular, multifunctional geometries to promote proper tissue integration.

Tissue engineering approaches can be divided into three strategies based on the scale of spatial organization. First, macrosopic strategy can be likened to traditional TE in which cells are seeded onto a macroporous scaffold. Cells are expected to colonize the inner volume of the scaffold by cell mobility and proliferation, and fluid flow. As described above, advances in the design of smart scaffolds and in the understanding of tissue maturation within bioreactor chambers have produced functional tissues [19]. However, smart scaffolds do not present the ability to mimic the functional multicellular anisotropy of the host tissue. Second, mesostructures are based on cells' ability to self-assemble and their capacity to maintain viability and function when located within the diffusion limit of nutrient supply. These modular blocks, also termed organoids, can be fabricated *in vitro* using replica molding [20,21] or by shaping multicellular spheroids [22]. The modular approach enable the production of 3D modules in a variety of shapes (e.g., cylinders) with a lateral diameter between 40 and 1000 µm and cell densities of 10^5–10^8 cells/cm², and to allow fabrication of multicellular constructs (e.g., bone-mimicking construct including both osteoblasts, osteoclasts and endothelial cells). Finally, reproducing the local cell microenvironment can be thought of as the ultimate target for TE and cell patterning. Conceptually, it could be defined as the capacity of positioning a single cell into its most suitable environment. Coordinated interactions between soluble factors, different cell types and extracellular matrices (i.e., mechanical and biochemical cues) should be taken into account. Such a cell niche manufacturing approach is unique in its purpose of dealing with tissue complexity and engineering a desired tissue from the bottom up. A scaffold-free, bottom-up approach to TE has been proposed [23]. Interestingly, Albrecht *et al.* have presented a method for the rapid formation of reproducible, high-resolution 3D cellular structures within a photopolymerizable hydrogel using dielectrophoretic forces [24]. This technology allows production of microscale cell organization. However, deposition of extracellular material can not be geometrically controlled using this approach.

To address some of the aforementioned issues, some authors have suggested building 3D biological structures using bioprinting: the precise computer-aided robotic deposit of living and nonliving biomaterials with the purpose of bioengineering 2D cellular patterns and 3D tissue constructs [25]. Commercially available ink-jet printers have been successfully employed [26,27] to pattern biological assemblies according to a computer-aided design template (blueprint). Pressure-operated mechanical extruders have also been developed to handle cells and cell aggregates [28]. Laser-assisted printing has emerged as an alternative technology, which has the ability to overcome some of the limitations of ink-jet and micro-pen printing devices, namely, the clogging (due to viscosity, cell agglomeration or ink drying) of print heads or capillaries used by these printers to achieve micron-scale resolution. In addition to laser-guided direct writing, which is a technique capable of trapping multiple cells in a laser beam and depositing them as a steady stream on arbitrary nonabsorbing surfaces [29], laser-assisted bioprinting (LAB) has been developed. Based on the laser-induced forward transfer (LIFT) process, LAB is potentially more efficient than laser-guided direct writing for cell patterning and TE; optical trapping allows manipulation of individual cells or cell aggregates in a matter of seconds, while LAB can manage virtually single cell deposit at a rate of kHz.

Mechanism of laser-assisted bioprinting

A typical LAB set-up is generally composed of three elements: a pulsed laser source, a target coated with the material to be printed (the ribbon) and a receiving substrate (Figure 1). The ribbon is a multilayer component: a support, which is transparent to the laser radiation wavelength, is coated with a transfer layer, named bioink, composed of the heat sensitive biological material to be printed (e.g., biomaterials, cells, biomolecules). Depending on the optical properties of the bioink or laser wavelength, a laser-absorbing interlayer is necessary to induce transfer and is placed between the support and the bioink; hence, the term biological laser printing [30] or absorbing-film assisted-LIFT [31] is preferred to matrix-assisted pulse laser evaporation-direct write (MAPLE-DW) [32], which implies the vaporization of the first molecular layers of the liquid. Such an interlayer eliminates direct interaction between the laser beam and the bioink, while 99% of the nonreflected incident beam may be transmitted in the case of MAPLE-DW. This interlayer consists of a thin film (tens of nm) of metal (Au, Ti, Ag), metal oxide (TiO_2) or photo-decomposing volatile polymer (triazene). Even if the LAB printing mechanism depends on many parameters (Figure 1), it was found that the volume of deposited material depends linearly on the laser pulse energy, and that a minimum threshold energy has to be overcome for microdroplet ejection to occur [33,34]. The technology behind these techniques has been increasingly refined in recent years giving new highlights to the three regimes which are typically conserved experimentally: subthreshold, jetting and plume regimes [35]. LAB can be described by the following sequence of events.

Laser energy deposit (1 J/cm²)

Pulsed-energy deposition (typically 1–20 µJ per pulse) can be performed by means of nano second lasers with UV wavelengths (i.e., excimer lasers 193 nm, 248 nm or triple- or quadruple-frequency neodymium-doped yttrium aluminium garnet lasers (266 and 355 nm, respectively) or else with near IR wavelength (1064 nm). The laser energy-absorbing material at the bioink–support interface (as in MAPLE-DW) or of/near the absorbing interlayer (as in biological laser printer) rapidly evaporates (including normal boiling and phase explosion) upon the absorption of laser pulse energy and further plasma formation, and may further form a vapor bubble that expands towards the free surface.

Vapor bubble growth & collapsing (1 µs)

Bubble growth and collapsing are critical phenomena since they govern the printing regime and because they are related to the intensity of mechanical stress applied to cells within the bioink (see below). In addition to time-resolved imaging, which provided time scale and morphological information [35,36], bubble dynamics have been modeled analytically (using the Rayleigh–Plesset equation) and

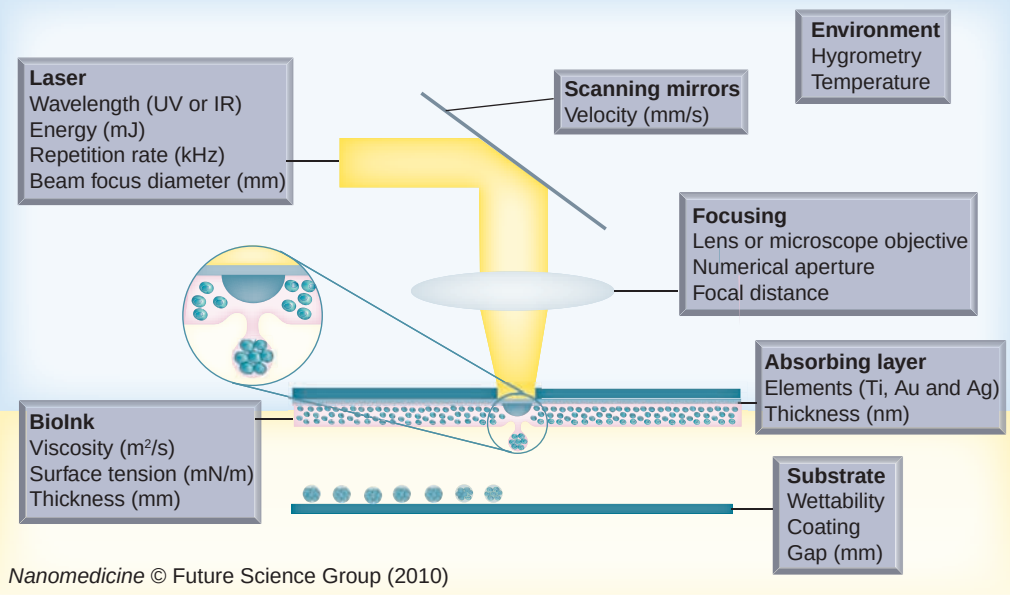


Figure 1. Laser-assisted bioprinting, featuring all the parameters involved in the process.

numerically [37,38] by including the effect of different medium material properties (e.g., viscosity and surface tension).

$$RR+\frac{3}{2}R^2=\frac{\kappa P\iota}{\rho\iota}\left(\frac{R_0}{R}\right)^{3y} - \frac{P\iota - P\upsilon}{\rho\iota} - 4\upsilon\frac{R}{R} - \frac{2\sigma\iota}{\rho\iota R}$$

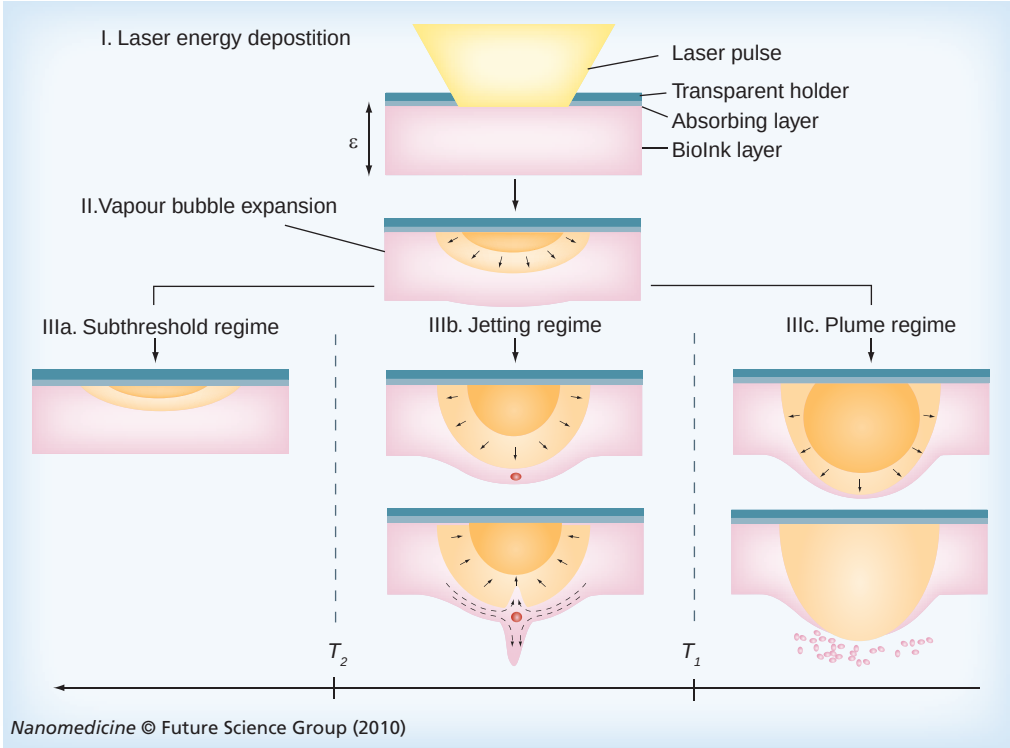
As a result, it was demonstrated that, depending on the bioink compressibility, the bubble front rapidly reaches its maximum velocity (up to 100 m/s, 100 ns after plasma-induced generation) while the maximum bubble radius R_{max} (meaning when collapsing starts) was reached later (1.2 µs) [34]. These values were shown to diminish by increasing medium viscosity while bubble dynamics was shown to be insensitive to surface tension.

Interaction of the vapor bubble with the free surface

Since the size of the vapor bubble is negligible compared with bioink thickness, the bubble interacts with the free surface, and hence surface tension has to be taken into account. In this regard, it has been demonstrated (for standoff conditions) that when the bubble reaches R_{max}, it begins to collapse due to a high pressure region generated in the bubble apex, and a jet may be formed according to the dimensionless distance Γ, which is the ratio between the distance, h (distance between the initial vapor bubble centroid and the free surface), and R_{max} [39,40].

$$\Gamma = \frac{h}{R_{\max}}$$

Consequently, the three above-mentioned regimes do not solely result from laser energy (E) intensity but also from rheological properties (e.g., viscosity [υ], surface tension [σ]) and film thickness (ε) of the bioink. In other words, jetting does not simply occur on the basis of an energy threshold mechanism [33] but rather on the basis of a complex Γ (E,υ,ε, σ) threshold mechanism. Over a given laser energy for which a vapor bubble is formed at the absorbing layer–bioink interface, the three above-mentioned regimes can be described (FIGURE 2):



Nanomedicine © Future Science Group (2010)

Figure 2. Mechanism for laser-induced droplet ejection. A vapor bubble is generated (see II) by vaporization of the absorbing layer and/or the first molecular layers of the liquid film. At given bioink viscosity and film thickness, jetting (see III.b) is observed for intermediary values of laser fluences ($\Gamma_1 < \Gamma < \Gamma_2$). For a lower fluence ($\Gamma > \Gamma_2$), the bubble collapses far from the free surface without generating a jet (see III.a). For a higher fluence ($\Gamma < \Gamma_1$), the bubble bursts to the surface, generating sub-micrometer droplets (see III.c). Increasing film thickness or bioink viscosity leads to increased threshold Γ values.

Table 1. Key milestones in the development of safe laser-assisted bioprinting procedures.

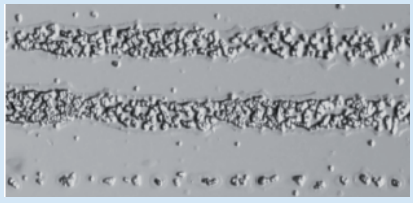
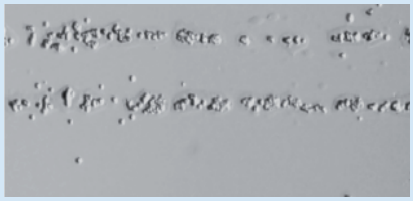
Laser-assisted cell printing method	Key milestones	Ref.
MAPLE-DW, 193 nm	Laser transfer by MAPLE-DW does not damage printed protein epitopes.	[52]
MAPLE-DW, 193 nm, 20 ns, 100 Hz	Transfer technique was found to be compatible with cell transfer as all transferred cells were found to be viable.	[32]
MAPLE-DW, 193 nm, 30 ns	When pluripotent embryonal carcinoma cells (P19) were printed onto a thick layer of Matrigel™ (> 40 µm), more than 90% of the cells survived the transfer process, remained viable and could differentiate into the neural or muscle cell lineage.	[46]
BioLP, 193 nm, 20 ns	A laser absorbing interlayer was placed between the incident laser pulse and biomaterials to be printed. Proof-of-principle experiments of multicolor printing and 3D cell pattern using BioLP (by spreading a 75 µm thick layer of Matrigel between each cell layer).	[30]
BioLP, 248 nm, 2 ns, 100 Hz	Number of cells per spot was shown to be determined by random sampling statistics. Demonstration of minimal expression of heat shock proteins by printed cells.	[53]
AFA-LIFT, 248 nm, 30 ns	Using time-resolved imaging, cell printing was shown to occur on a 1 µs time scale at a constant velocity with an estimated acceleration of 10^7 m/s^2.	[31]
MAPLE-DW, 193 nm, 10 Hz	Co-deposition of hydroxyapatite, MG 63 osteoblast-like cells and extracellular matrix demonstrated the possibility to print complex bioinks.	[54]
MAPLE-DW, 193 nm	Formation of a 3D neural network by transferring B35 neuronal cells to different depths in Matrigel by applying increasing laser fluences (energy per surface; J/m^2).	[55]
MAPLE-DW, 193 nm, 30 ns, 10 Hz, triazene layer	An intermediate layer of absorbing triazene polymer (dynamic release layer) was used to provide a gentler and more efficient printing (i.e., at lower fluences than usual) of B35 neuroblast cells.	[56]
LIFT, 800 nm, 120 fs, 1 kHz	Gap between NIH3T3 fibroblasts containing ribbon and substrate was filled by culture medium to avoid cell stress due to film drying.	[57]
MAPLE-DW, 355 nm, 15 ns	Mammalian embryonic stem cells were printed using a thick polyimide absorbing layer, which differs from a dynamic release layer.	[58]
BioLP, 266 nm, 5 ns, TiO_2 (40 nm)	Glycerol was substituted with methyl cellulose to avoid ink dehydration without toxic effects.	[42]
MAPLE-DW, 93 nm, 300 Hz, triazene DRL	Single-cell printing and groups of cells (approximately 20–40 cells) were obtained when the ribbon was preliminary seeded with a lower cell concentration and near 100% confluence, respectively.	[59]
MAPLE-DW, 193 nm, 2 ns	Some of the MAPLE-DW process-induced damage to yeast cells was reversible and the post-transfer yeast cell recovery was a function of the laser fluence (85–1500 mJ/cm^2)	[44]
Laser-assisted bioprinting, 1064 nm, 5–10 kHz	High-throughout cell printing (up to tens of thousands of droplets per second) was demonstrated using an original workstation. EA.hy926 endothelial cells remained viable after printing using a near-IR nano second laser.	[43]

BioLP: Biological laser printe; DRL: Dynamic release layer; LIFT: Laser-induced forward transfer; MAPLE-DW: Matrix-assisted pulse laser evaporation-direct write.

- If Γ is higher than a threshold value Γ_2 the droplet ejection cannot occur since the bubble expansion is too weak to reach the free surface much; see III.a in Figure 2). This is termed the subthreshold scenario, in which no material can be transferred except if the substrate is in close proximity with the ribbon;
- When Γ is lower than a threshold value Γ_1 the bubble expansion is so violent that it overcomes surface tension resulting in bubble bursting, and hence, liquid splashing onto the substrate; see III.c in Figure 2). This is therefore termed the plume scenario
- If Γ is between Γ_1 and Γ_2: the bubble expands, then collapses and finally a jet is formed; see III.b in Figure 2). Termed the jetting scenario.

Jetting (50 m/s)

By using time-resolved imaging, Duocastella *et al.* recently demonstrate that a long and uniform jet is developed, which advances at a constant velocity (20–150 m/s, depending on experimental conditions) until it reaches the receptor substrate [41]. For the lowest fluences leading to jet formation (e.g., $\Gamma \rightarrow \Gamma_2$), the jet may recoil before reaching the substrate. However, reduction of the gap distance could lead to material deposition onto the receptor substrate. At higher fluences ($\Gamma \rightarrow \Gamma_1$), the jet inertia is high enough to surpass the recoiling force exerted by the surface tension and elasticity of the ink. When a jet has reached a certain length, it becomes unstable and finally breaks due to surface tension effects in the so-called Rayleigh–Plateau instability.

Diaphragm aperture stop (mm)	Laser energy (μJ)
18	
11	16
5	
18	
11	8
5	

Figure 3. Cell printing resolution according to the diaphragm aperture stop (mm) and the laser energy deposit (μJ). The cell concentration of the ink (DMEM, 1% alginate (w/v), 5% glycerol) was 10^8 cell/ml. × 25 magnification.

Deposit: landing

Depending on substrate surface properties, the kinetic energy of the droplet/jet as well as bioink viscosity, droplets collected onto the substrate may exhibit different morphologies, which can be related to splashing and spreading phenomena. This has not been studied in LAB conditions, although it is an important issue in surface science. For moderate initial energies, the surface tension will be able to absorb the initial kinetic energy while for higher energies, the surface tension is not sufficient to stop the outward motion as the drop spreads upon impact, which induces formation of small satellite droplets. In addition, viscosity has been shown to minimize the splashing effect for a given condition of droplet landing onto one substrate [GUILLEMOT *ET AL.* UNPUBLISHED DATA].

Droplets as small as 8 μm have been experimentally produced by reducing the air gap distance and thus working in conditions close to the subthreshold scenario ($\Gamma \rightarrow \Gamma_2$) [33].

Considering safe & high resolution procedures using laser assisted cell printing

Laser-assisted cell printing has been performed in numerous studies over the last five years. Key milestones on the way to developing safe laser-assisted cell printing procedures are reported in TABLE 1. During this period of time, the potential damages caused by the above-mentioned printing steps have been addressed. Besides virus- or microorganism-induced injuries, cell integrity and cell fate might be altered by mechanical, thermal, chemical or/and biochemical stresses. Regarding the LAB process, and considering that sub-threshold and plume scenarios are not compatible with controllable and safe procedures, cell injury may be associated with: bioink composition, interactions of cellular components with light, pressure generated during bubble growth, shear stress within the jet and landing conditions.

Regarding chemical change, biocompatibility of the cell-containing matrices have been addressed with a focus on glycerol content, which is routinely added to avoid dehydration of the bioink caused by the unfavorable surface-to-volume ratio once it is spread onto the ribbon. To limit toxicity induced by glycerol, it has been replaced with methyl cellulose [42]. Also, high-throughput printing may be carried out to reduce evaporation [43]. Indeed, it was recently shown that high speed cell printing (1–100 kHz) is possible and dramatically shortens the printing process [GUILLOTIN B, SOUQUET A, CATROS S *ET AL.*: CELL PRINTING ASSISTED BY LASER DOES NOT PRESENT A COMPROMISE BETWEEN RESOLUTION AND SPEED. UNPUBLISHED DATA].

While calculations have shown that much of the laser energy passes completely through the liquid layer, raising the possibility that the UV laser light could damage the biological structures, it has recently been demonstrated that yeast cells do not suffer from UV irradiation when printed by MAPLE-DW [44]. Nevertheless, this issue remains relevant to *in vivo* printing when body tissues are irradiated for a longer duration [45].

Cell damage due to mechanical stress during laser-assisted cell printing has been observed and is an important issue for further innovations in TE. Mechanical stress can have many origins: increasing hydrodynamic pressure during bubble growth (it was estimated to be a few MPa at a certain distance from bubble front [37]) shear stress during jetting (which depends on jetting speed and thus Γ conditions); and landing conditions (which are governed by the initial jet velocity and the softness and thickness of the substrate). As described above, increasing bioink viscosity or alternatively, reducing laser energy, leads to both reduced bubble expansion velocity and jet front speed. Regarding landing conditions, Ringeisen *et al.* have shown that cell viability is increased to 95% when the substrate is coated by a 40-μm thick Matrigel™ layer [46]. By means of numerical modeling, this result was correlated by Wang *et al.* to a decrease of the first impact-induced stress (von Mises stress) from 3 MPa to 0.86 MPa (for a 50 m/s jet velocity), respectively,

while second impact-induced stress (onto a hard substrate) may also be observed when mattress thickness is less than 40 µm (0.94 MPa for 20-µm coating thickness) [47]. Alternatively or additionally to the landing mattress, a high viability level can also be obtained when a viscous bioink, such as an alginate solution is used [43]. Heat shock protein 60/70 expression has been studied as a potential marker of heat and shear stress sensed by the cells during the printing process [31]. Results show that heat shock protein 60/70 expression is not altered in printed cells compared with control cells. The absence of a detectable effect of LAB on the printed cells has been demonstrated [48]. These data suggest the printed cells may have been exposed to an elevated heat or shear stress for a period of time short enough (few µs) to keep damage below detection thesholds.

Nevertheless, even if safe cell-printing procedures are developed, further studies need to performed to rule out any cell damage, and to determine the effective ratio between the number of printed cells and the number of cells embedded into the ink that are crossed by the laser beam.

Regarding cell printing resolution, LAB sets the benchmark as it is able to print cells one by one, next to each other. Given a 10 µm diameter for a nonadherent cells, maximum cell printing resolution is 1000 cells per cm. Such a resolution has been achieved recently at a high printing speed (5 kHz) (Figure 3) [44]. Although optimization remains possible in terms of higher throughput and higher resolution, such printing resolution and speed are key requirements for cell microarray production or 3D construct fabrication.

Future perspective

In the near future, LAB should be refined thanks to numerical studies that have been recently undertaken [37,38]. Hence, transient values for heat and pressure should be determined and subsequently controlled through manipulation of experimental parameters (e.g., irradiation conditions). Moreover, while jetting conditions have been shown to be subject to a complex threshold mechanism involving energy, viscosity and film thickness, the effects of viscoelastic ink properties on jet formation and recoil should be addressed. Finally, printing conditions without a metallic interlayer should be developed to avoid the potential cytotoxic effect of its residues.

In our opinion, the main issues over the next 5–10 years concerns biological and developmental studies. Developing tools such as LAB would allow us to create and manipulate the *in vitro* cell microenvironment on demand by controlling intensity and shape of cell patterns and morphogen gradients [49,50]. Studies would also deal with generating artificial cell niches by co-depositing a suitable combination of stem cells with extracellular matrix components [51]. In relation to these issues, mechanical and topological cues should be studied using bottom-up approaches for engineering tissues. Combining LAB with other laser-assisted processes, such as machining and polymerization, should be addressed with specific attention on integrating these different processes in the same workstation to guarantee subcellular resolution. Finally, while cell chip fabrication using LAB can be envisaged, other original applications such as medical robotics should be developed in the coming years [46], allowing LAB workstations to leave physics laboratories for biological benches [52–59].

Executive summary

- Regenerative medicine is the process of creating living, functional tissues to repair or replace tissue or organ function lost due to age, disease, damage or congenital defects.
- Bioprinting consists of computer-aided robotic transfer of living and nonliving biomaterials with the purpose of bioengineering 2D cellular patterns and 3D tissue constructs.
- Laser-assisted bioprinting (LAB) is based on the laser-induced forward-transfer (LIFT) technique in which a pulsed laser is used to induce the transfer of material from a source film spread onto an optically transparent quartz support to a substrate in close proximity to or in contact with the film.
- LAB is a noncontact, nozzle free, high resolution and high speed bioprinting technique. It allows the deposition of volumes smaller than a picoliter, at a micrometer scale resolution and at a meter per second writing speed.
- Jetting conditions are subject a complex threshold mechanism involving laser pulse energy, surface tension and viscoelastic properties of the bioink, as well as the bioink film thickness.
- Printed cell viability and preservation of cellular function are strongly related to hydrodynamics, which govern cell landing conditions onto the substrate.
- Complex multicomponent and 3D printing have already been performed.
- In addition to *in vitro* printing of cells and biomaterials, *in vivo* LAB is also feasible, which offers new opportunities in the field of medical robotics.
- LAB could enable the on-demand creation and manipulation of *in vitro* cell microenvironment by controlling intensity and shape of cell patterns and morphogen gradients.

Financial & competing interests disclosure

The authors would like to thank the cluster Advanced Materials in Aquitaine, Region Aquitaine, and the Agence de la Biomédecine for financial support. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

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

Bibliography

1 Lalan S, Pomerantseva I, Vacanti JP: Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J. Surg.* 25(11), 1458–1466 (2001).

2 Lysaght MJ, Jaklenec A, Deweerd E: Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. *Tissue Eng. Part A* 14(2), 305–315 (2008).

3 Yamada KM, Cukierman E: Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 130(4), 601–610 (2007).

4 Baquey C: *Organes Artificiels Hybrides, Concepts et Développement.* Editions INSERM, Paris, France (1989).

5 Langer R, Vacanti J: Tissue engineering. *Science* 260(5110), 920–926 (1993).

6 Place ES, Evans ND, Stevens MM: Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat. Mater.* 8(6), 457–470 (2009).

7 L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM: Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N. Engl. J. Med.* 357(14), 1451–1453 (2007).

8 Auger FA, Rémy-Zolghadri M, Grenier G, Germain L: A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* (35), 73–88 (2002).

9 Yang J, Yamato M, Shimizu T *et al.*: Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials* 28(34), 5033–5043 (2007).

10 Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB: Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 367(9518), 1241–1246 (2006).

11 Priya SG, Jungvid H, Kumar A: Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14(1), 105–118 (2008).

12 Ko HCH, Milthorpe BK, McFarland CD: Engineering thick tissues – the vascularisation problem. *Eur. Cell Mater.* 14, 1–18; discussion 18–19 (2007).

13 Griffith LG, Naughton G: Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science* 295(5557), 1009–1014 (2002).

14 Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA: Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng.* 12(9), 2685–2693 (2006).

15 Rivron NC, Rouwkema J, Truckenmüller R, Karperien M, De Boer J, Van Blitterswijk CA: Tissue assembly and organization: developmental mechanisms in microfabricated tissues. *Biomaterials* 30(28), 4851–4858 (2009).

16 Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW: Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324(5935), 1673–1677 (2009).

17 Ingber DE: Mechanical control of tissue growth: function follows form. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102(33), 11571–11572 (2005).

18 Engler AJ, Humbert PO, Wehrle-Haller B, Weaver VM: Multiscale modeling of form and function. *Science* 324(5924), 208–212 (2009).

19 Martin I, Wendt D, Heberer M: The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 22(2), 80–86 (2004).

20 McGuigan AP, Sefton MV: Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103(31), 11461–11466 (2006).

21 McGuigan AP, Bruzewicz DA, Glavan A, Butte M, Whitesides GM: Cell encapsulation in sub-mm sized gel modules using replica molding. *PLoS ONE* 3(5), E2258 (2008).

22 Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR: Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 30(12), 2164–2174 (2009).

23 Voldman J: Engineered systems for the physical manipulation of single cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17(5), 532–537 (2006).

24 Albrecht DR, Underhill GH, Wassermann TB, Sah RL, Bhatia SN: Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nat. Meth.* 3(5), 369–375 (2006).

25 Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR: Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 21(4), 157–161 (2003).

26 Boland T, Xu T, Damon B, Cui X: Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol. J.* 1(9), 910–917 (2006).

27 Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F *et al.*: Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. *Tissue Eng.* 11(11–12), 1658–1666 (2005).

28 Jakab K, Norotte C, Damon B *et al.*: Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. *Tissue Eng. Part A* 14(3), 413–421 (2008).

29 Nahmias Y, Schwartz RE, Verfaille CM, Odde DJ: Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 92(2), 129–136 (2005).

30 Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR: Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed. Microdevices* 6(2), 139–147 (2004).

31 Hopp B, Smausz T, Kresz N *et al.*: Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. *Tissue Eng.* 11(11–12), 1817–1823 (2005).

32 Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB: Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films* 453–454, 383–387 (2004).

33 Colina M, Serra P, Fernández-Pradas J, Sevilla L, Morenza J: DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosens. Bioelectron.* 20(8), 1638–1642 (2005).

34 Duocastella M, Colina M, Fernández-Pradas J, Serra P, Morenza J: Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. *Appl. Surf. Sci.* 253(19), 7855–7859 (2007).

35 Young D, Auyeung RCY, Piqué A, Chrisey DB, Dlott DD: Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy. *Appl. Surf. Sci.* 197–198, 181–187 (2002).

36 Duocastella M, Fernández-Pradas J, Serra P, Morenza J: Jet formation in the laser forward transfer of liquids. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 93(2), 453–456 (2008).

37 Wang W, Li G, Huang Y: Modeling of bubble expansion-induced cell mechanical profile in laser-assisted cell direct writing. *J. Manuf. Sci. Eng.* 131(5), 051013 (2009).

38 Mezel C, Hallo L, Souquet A, Breil J, Hebert D, Guillemot F: Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime. *Phys. Plasmas* 16(12), 123112 (2009).

39 Pearson A, Cox E, Blake JR, Otto SR: Bubble interactions near a free surface. *Eng. Anal. Bound. Elem.* 28(4), 295–313 (2004).

40 Robinson PB, Blake JR, Kodama T, Shima A, Tomita Y: Interaction of cavitation bubbles with a free surface. *J. Appl. Phys.* 89(12), 8225–8237 (2001).

41 Duocastella M, Fernandez-Pradas J, Morenza JL, Serra P: Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids. *J. Appl. Phys.* (2010) (In Press).

42 Othon CM, Wu X, Anders JJ, Ringeisen BR: Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells. *Biomed. Mater.* 3(3), 034101 (2008).

43 Guillemot F, Souquet A, Catros S *et al.*: High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater.* DOI: 10.1016/j.actbio.2009.09.029, (2009) (Epub ahead of print).

44 Lin Y, Huang Y, Chrisey DB: Droplet formation in matrix-assisted pulsed-laser evaporation direct writing of glycerol-water solution. *J. Appl. Phys.* 105(9), 093111 (2009).

45 Keriquel V, Guillemot F, Arnault I *et al.*: Bioprinting for computer- and robotic assisted medical intervention: a new perspective? *Biofabrication* 2(1), 014101, 8 (2010).

46 Ringeisen BR, Kim H, Barron JA *et al.*: Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells. *Tissue Eng.* 10(3–4), 483–491 (2004).

47 Wang W, Huang Y, Grujicic M, Chrisey DB: Study of impact-induced mechanical effects in cell direct writing using smooth particle hydrodynamic method. *J. Manuf. Sci. Eng.* 130(2), 021012 (2008).

48 Koch L, Kuhn S, Sorg H *et al.*: Laser printing of skin cells and human stem cells. *Tissue Eng. Part C Methods* (2009) (Epus ahead of print).

49 Nelson CM, Tien J: Microstructured extracellular matrices in tissue engineering and development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17(5), 518–523 (2006).

50 Nelson CM: Geometric control of tissue morphogenesis. *Biochem. Biophys. Acta* 1793(5), 903–910 (2009).

51 Lutolf MP, Blau HM: Artificial stem cell niches. *Adv. Mater.* 21(32–33), 3255–3268 (2009).

52 Ringeisen BR, Wu PK, Kim H *et al.*: Picoliter-scale protein microarrays by laser direct write. *Biotechnol. Prog.* 18(5), 1126–1129 (2002).

53 Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR: Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. *Ann. Biomed. Eng.* 33(2), 121–130 (2005).

54 Doraiswamy A, Narayan RJ, Harris ML, Qadri SB, Modi R, Chrisey DB: Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites. *J. Biomed. Mater. Res. A* 80A(3), 635–643 (2007).

55 Patz TM, Doraiswamy A, Narayan RJ *et al.*: Three-dimensional direct writing of B35 neuronal cells. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 78B(1), 124–130 (2006).

56 Doraiswamy A, Narayan R, Lippert T *et al.*: Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer. *Appl. Surf. Sci.* 252(13), 4743–4747 (2006).

57 Kaji T, Ito S, Miyasaka H *et al.*: Nondestructive micropatterning of living animal cells using focused femtosecond laser-induced impulsive force. *Appl. Phys. Lett.* 91(2), 023904 (2007).

58 Kattamis NT, Purnick PE, Weiss R, Arnold CB: Thick film laser induced forward transfer for deposition of thermally and mechanically sensitive materials. *Appl. Phys. Lett.* 91(17), 171120–71123 (2007).

59 Schiele NR, Koppes RA, Corr DT *et al.*: Laser direct writing of combinatorial libraries of idealized cellular constructs: biomedical applications. *Appl. Surf. Sci.* 255(10), 5444–5447 (2009).

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

IRBM

IRBM 31 (2010) 226–233

Original article

Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature

Hydroxyapatite nano-cristalline synthétisée à basse température : propriétés physico-chimiques et biologiques

S. Catros [a,*,b], F. Guillemot [a], E. Lebraud [c], C. Chanseau [a], S. Perez [b], R. Bareille [a], J. Amédée [a], J.C. Fricain [a,b]

[a] *Inserm U577, University Victor-Segalen Bordeaux-2, 33076 Bordeaux, France*
[b] *Dental School, University Victor-Segalen Bordeaux-2, 33076 Bordeaux, France*
[c] *CNRS, Bordeaux University, ICMCB, 87, avenue du Dr-A.-Schweitzer, 33608 Pessac cedex, France*

Received 4 January 2010; received in revised form 8 March 2010; accepted 15 April 2010

Abstract

Objective. – The aim of this work was to synthesize and to characterize chemically and biologically (*in vitro* and i*n vivo)* a nano-sized hydroxyapatite (nHA).
Materials and methods. – Wet chemical precipitation at room temperature was performed, then chemical structure was explored using transmission electron microscopy, X-ray diffraction and Fourier transformed infrared spectroscopy. In vitro biological characterization was done using MG63 osteoblastic cell line cultured onto the material, and characterization was done for morphology (scanning electron microscopy), viability (live/dead assay) and proliferation (MTT test). Finally, nHA powder was tested in vivo in a study involving C57 Black mice for bone repair in a calvarial bone critical sized defect.
Results. – Morphological, physico-chemical and cristallographic analyses revealed specific features of hydroxyapatite. Biological *in vitro* experiments revealed high affinity and proliferative ability of MG63 cells cultured onto the material. *In vivo* study displayed that in this model, the material allowed to repair bone continuity after 1 month healing.
Discussion and conclusions. – The different ways of nHA synthesis are discussed regarding the potential application of the material. The obtained material should find applications in bone tissue engineering experiments.
© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Low temperature hydroxyapatite; FTIR; XRD; In Vitro; In Vivo

Résumé

Objectif. – L'objectif de cette étude était de synthétiser et de caractériser au niveau chimique et biologique (in vitro and in vivo) une hydroxyapatite nano-cristalline.
Matériels et méthodes. – Le matériau a été synthétisé par précipitation humide, puis sa structure a été étudiée par microscopie électronique à transmission, par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et par diffraction des rayons X. La caractérisation biologique in vitro a été faite en utilisant des ostéoblastes de lignée MG63 cultivés en présence du matériau : la morphologie, la viabilité et la prolifération des cellules ont été évaluées par microscope électronique à balayage, par le test de Live/Dead et par des tests au MTT, respectivement. Enfin, une étude in vivo de la réparation osseuse a été réalisée en utilisant le matériau pour combler un défaut osseux critique sur la calvaria de souris C57 Black.
Résultats. – L'analyse morphologique, physico-chimique et cristallographique a permis de retrouver des caractéristiques spécifiques des cristaux d'hydroxyapatite. L'étude biologique in vitro a montré une forte affinité et une prolifération des cellules MG63 sur le matériau. Enfin, l'utilisation in vivo du matériau a permis d'obtenir une restauration de la continuité osseuse complète après un mois.

* Corresponding author.
E-mail address: sylvaincatros@hotmail.com (S. Catros).

1959-0318/$ – see front matter © 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.irbm.2010.04.002

Author's personal copy

Discussion et conclusions. – Les différentes méthodes de synthèse de l'hydroxyapatite ont été discutées en fonction de leur application. Ce matériau pourrait trouver des applications en ingénierie tissulaire osseuse.
© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Hydroxyapatite nano-cristalline synthétisée à basse température ; FTIR ; DRX ; In vivo ; In vitro

1. Introduction

Surgical repair of critical sized bone defects is currently performed in orthopedics or maxillo-facial surgery using several strategies that often requires bone grafts or bone substitutes to obtain a functional tissue [1]. Although current gold standard for bone repair is represented by autologous bone grafts that brings all osteoinductive elements on reconstructed site, the inherent morbidity of this technique onto donor site and limited amount harvested have led to the development of hetero- or xeno-grafts substitutes. Drawbacks of these materials are due to potential persistence of infectious or antigenic elements in the materials, then synthetic substitutes have been developed with the common objective to match biological and mechanical properties of human bone. Among the numerous synthetic materials for bone repair elaborated [2], many ceramics have proven their biocompatibility and ability to bond bone minerals directly and to support bone formation by osteoconduction.

Ceramics are generally obtained after a two-step procedure involving first, precipitation of calcium phosphate crystals and second, growth and stabilization of crystallites during high temperature sintering process. According to primary reactants, precipitation and sintering conditions, numerous calcium phosphate-based materials can be obtained, which may be divided into resorbable and non-resorbable materials. Resorbability is an essential parameter for bone repair materials because it allows new bone formation and graft replacement during healing period [3]. Resorbable ceramics are mainly represented by ß-tricalcium phosphate (ß-TCP), which is a product of sintering calcium phosphate precipitates [2]. Another group of resorbable calcium phosphate materials were called low-temperature apatites (LTA) because of their production at room temperature and their non-sintered state. As a consequence, LTA possess a larger specific surface area (SSA) than sintered apatites, which make them resorbable [4] and highly biocompatible [5]. Recently, it was demonstrated that in specific post-synthesis conditions of LTA, clinically relevant mechanical properties may be added to the material, without alterations of LTA specific surface properties [6].

The mineral part of human bone is mainly made of nano-sized carbonated hydroxyapatite crystals, which represents 65% of its total weight [7,8]. To mimic these elements, low-temperature apatites are well adapted. Indeed, because of the way they are synthesized (room temperature, no sintering), they possess a high specific surface area (SSA) (20–100 m^2/g), close to that of bone [5]. However, biological *in vivo* and *in vitro* properties of these materials have never been completely studied.

The objective of this paper is to evaluate the biocompatibility of a low-temperature nano-sized hydroxyapatite (nHA) for bone tissue engineering applications. The first part of this paper presents the synthesis and chemical characterization of nHA powder using wet chemical precipitation at room temperature. Then, biocompatibility of the material is reported through biological *in vitro* and *in vivo* experiments using osteoblastic-like MG63 cells and calvarial bone critical sized defects in mice, respectively.

2. Materials and methods

2.1. Nano-hydroxyapatite synthesis

Nano-hydroxyapatite was prepared by wet chemical precipitation as described elsewhere [9] using a 0.6 M solution of phosphoric acid (H_3PO_4 Rectapur, Prolabo®, Paris, France) and a 1 M solution of calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$ Alfa Aesar, Germany). Hundred millilitres of H_3PO_4 solution were added drop by drop in 100 ml of $Ca(OH)_2$ solution during 30 min under vigorous stirring at ambient temperature. At the end of reaction, pH was adjusted to 10 using 0.5×10^{-3} mol of a 0.6 M sodium hydroxyde solution, then stirring was continued during 12 h.

2.1.1. Physico-chemical characterization of nHA powder

Morphological observations of crystallites were performed under a transmission electron microscope (JEOL TEM 200 FX electron microscope, LaB6 cathod) working at 200 keV after nHA slurry deposition and drying on a carbon grid. Elemental micro-analysis was also performed during TEM experiments using X-rays microanalysis.

The as-synthesized solution was filtered and dried overnight in an oven (70 °C, 12 h) for physico-chemical characterization, then the material was milled with pestle and mortar in order to obtain a fine powder. This material was examined by Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR) (JASCO FT/IR 460 plus, Japan) for chemical analysis using 32 scans for acquisition and a resolution of 2 cm^{-1}. Structural properties were explored by X-ray diffraction (XRD) using PANalytical X'pert MPD-PRO diffractometer (Bragg Brentano Theta-Theta geometry), with a copper anticathod (mean lamba Kalpha = 15,418 Å), the working tension and intensity were 40 kV and 40 mA, respectively. Lattice parameters were evaluated using phase identification through Diffract Plus Eva Software (Bruker©).

2.1.2. In vitro characterisation of nHA powder

nHA powder obtained after heat drying (70 °C, 12 h) was sterilized through UV exposure during 2 h before *in vitro* experiments. The MG63 cell line was used for biological characterization [10]. Cells were seeded in 24-wells plates at

Author's personal copy

50,000 cells/cm^2 in contact with the material and were cultured using Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, InVitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco). Cells were tested for viability/mortality after 3 and 6 days using live/dead assay viability/cytotoxicity kit, according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). Cell proliferation was evaluated using MTT assay (Sigma-Aldrich, France). After 3 days, early osteoblastic cell phenotype was evaluated using alcaline phosphatase (ALP) kit (Sigma-Aldrich, France). Following cells fixation, dehydration and sputtering with gold, scanning electron microscopy (SEM) observations were done using a Hitachi® S-2500 (Tokyo, Japan) scanning electron microscope working at 10 keV to evaluate morphological interactions between MG63 cells and nHA.

2.1.3. *In vivo evaluation of nHA powder for bone repair*

The material was evaluated qualitatively *in vivo* using calvarial bone critical sized defect in C57 Black Mice. Briefly, eight adult mice (24-week-old) were used in this study and were anesthetized through peritoneal injection of ketamin and xylazin. After skin antisepsis (Betadine, France), an incision was performed in skull midline and the scalp was dissected to expose the calvarial. Periosteum was carefully peeled off and two lateral 4-mm-wide calvaria bone defects were performed in each animal using a 4-mm-diameter trephine (TBR, Toulouse, France). Surgical procedures were performed under constant saline irrigation and care was taken to prevent dura mater injury. NHA powder was mixed with 0.9% NaCl (w/v) solution extemporaneously in order to obtain an easy-to-handle paste. Then, one defect was used for nHA filling while the contralateral site was untreated as negative control.

The animals were sacrificed after 1 month ($n = 4$) and 3 months ($n = 4$) via exposure to hyperbaric carbon dioxide. At each time point, the skulls were harvested in block ($n = 4$), then fixed in formaldehyde (4%) during 3 days, and finally distributed as follows: Two samples were prepared for decalcified sections and two samples were prepared for undecalcified sections.

Decalcified sections were prepared using a bone decalcifying solution during 12 h (Decalcifiant osseux BAYER, ref 70033, France), then were dehydrated in ethanol (70%, 80%, 95%, 100%) and embedded in paraffin. Ten microns coronal sections were cut and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) and observed under a photo-microscope (Nikon eclipse 80i, The Netherlands). Slides were observed for immature and mature bone tissue, presence of nHA and inflammation.

For undecalcified sections, all samples were dehydrated in ethanol (70, 80, 90, and 100%), thereafter in pure isopropanol, and then were embedded in a methyl-metacrylate butyl-metacrylate solution [11]. Sections (80 mm) were obtained using a microtome (Leica SP 1600, Germany) and stained with light green of Masson Trichrome. Eight slides were obtained for each sample. Specimens were qualitatively examined for mature bone tissue, osteoblasts cells, and the interface between the material and new bone formation.

3. Results

3.1. *Morphological and physico-chemical characterization of nHA powder*

The yield of reaction was 96% (ratio between measured weight of nHA powder versus theoretical weight calculated). Morphological analyses using transmission electron microscopy revealed 50 to 100 nm long rod-like crystals (Fig. 1a).

FTIR analysis displayed specific vibrations for bands present in hydroxyapatite crystals: phosphate groups were detected at 960 cm^{-1} (ν1 PO_4^{3-}), 1033 cm^{-1} (ν3 PO_4^{3-}), 570 cm^{-1} and 601 cm^{-1} (ν4 PO_4^{3-}); OH– band was identified at 3568 cm^{-1} inside the H_2O region. Furthermore, carbonate bands were observed at 1420 cm^{-1} (ν3 CO_3^{2-}) and 868 cm^{-1} (ν2 CO_3^{2-}) (Fig. 1b).

Following X-ray diffraction (XRD) analysis of the material, phase identification through JCPDS-ICDD data (Diffract-Plus Software, Bruker) was compatible with a carbonated hydroxyapatite [$Ca_{10}(PO_4)_3(CO_3)_{0,01}(OH)_{1,3}$], displaying hexagonal lattice parameters ($a = 9.44$ Å; $c = 6.88$ Å) (Fig. 1c).

Finally, X ray quantitative micro-analysis were performed during TEM observations revealed a Ca/P ratio of 1.67 (Fig. 1d).

3.1.1. *Biological characterization of nHA powder*

After culturing MG63 on nHA during 12 days, live-dead assay was strongly positive for viability and cells were spread on the material (Fig. 2a), which was confirmed by SEM observations (Fig. 2b). Alcaline phosphatase activity of cells cultured on nHA after 3 days was similar to control cells (Fig. 2c). MTT proliferation assay displayed that cells proliferate exponentially on the material after 6 days of culture (Fig. 2d).

3.1.2. *Calvarial bone repair after nHA powder filling*

All animals survived to experimental procedure and macroscopic examination of calvarial samples after soft tissues removal displayed evidence for hard tissue on test calvarial defects (Fig. 3a). Macroscopically, it was not observed any migration of the material from the implanted site to the control site.

After 1 month, undecalcified frontal sections of calvaria displayed a complete filling of bone defect on test site; higher magnification displayed nHA and fibrous tissues on test sites with partial bone repair at this time. On control sites, fibrous tissue were present inside calvarial defects, without any bone formation (Fig. 3b).

After 3 months, undecalcified frontal sections of calvarial bone stained with light green displayed nHA crystals embedded in bone matrix. Decalcified sections confirmed the presence of bone trabeculae around nHA aggregates. Neither space nor fibrous tissue was found between nHA aggregates and bone. On control sites, a partial repair was observed due to natural healing after this long period of time (Fig. 3c).

Author's personal copy

4. Discussion

In this paper, a nano-hydroxyapatite powder was synthesized through wet chemical precipitation at low temperature and displayed specific chemical features of nHA. In vitro experiments have shown that this material was biocompatible with osteoblastic-like MG63 cells and led to the formation of mature bone tissue in vivo on mice calvarial critical sized defects. The material was dried at 70 °C before physico-chemical characterization and biological experiments.

Numerous processing routes exist for nano-hydroxyapatite synthesis, using wet chemical precipitation [12], synthesis in synthetic body fluid [13], reverse microemulsion [14], sol–gel reaction [15] or electrophoretic deposition [16]. These methods are all based on the chemical complexation of phosphate and calcium ions delivered by solubilized salts and differ through primary reagents composition, reactant addition rate, reaction temperature, reaction pH and post-synthesis aging time. Wet chemical precipitation of calcium hydroxide and phosphoric acid allow to produce a nano-sized hydroxyapatite after a simple reaction involving two aqueous solutions of calcium hydroxide and phosphoric acid, and only produces water as by-products [12]:

$$10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O$$

Bouyer et al. have defined the optimal synthesis conditions of pure and monocrystalline HA: the addition rate of phosphoric acid solution must be moderate (below 100 ml/min) and the reaction temperature should be lower than 60 °C. Finally, the pH must be 10 at the end of reaction [17,18]. These conditions were respected in this study and the results were consistent with previous publications. Indeed, morphological analysis displayed 50 to 100 nm rod-like crystals and hydroxyapatite chemical structure was confirmed through infrared spectroscopy and X ray diffraction. As the yield of reaction was 96%, it was considered that most of the by-product of this synthesis route was water, and that no purification step was necessary before biological *in vitro* and *in vivo* experiments. In contrary, the addition of solvents and surfactants to prevent particles aggregation has lead to toxic and not biocompatible by-products with other nHA synthesis routes [14,15] that requires the use of post-processing rinsing steps. In this study, the material was left for aging in solution at the end of reaction and ultrasonicated for particles separation [19].

The chemical characterization using FTIR revealed vibrations present in hydroxyapatite crystals, including phosphate and hydroxyl bands [20]. Although Ca/P ratio was calculated

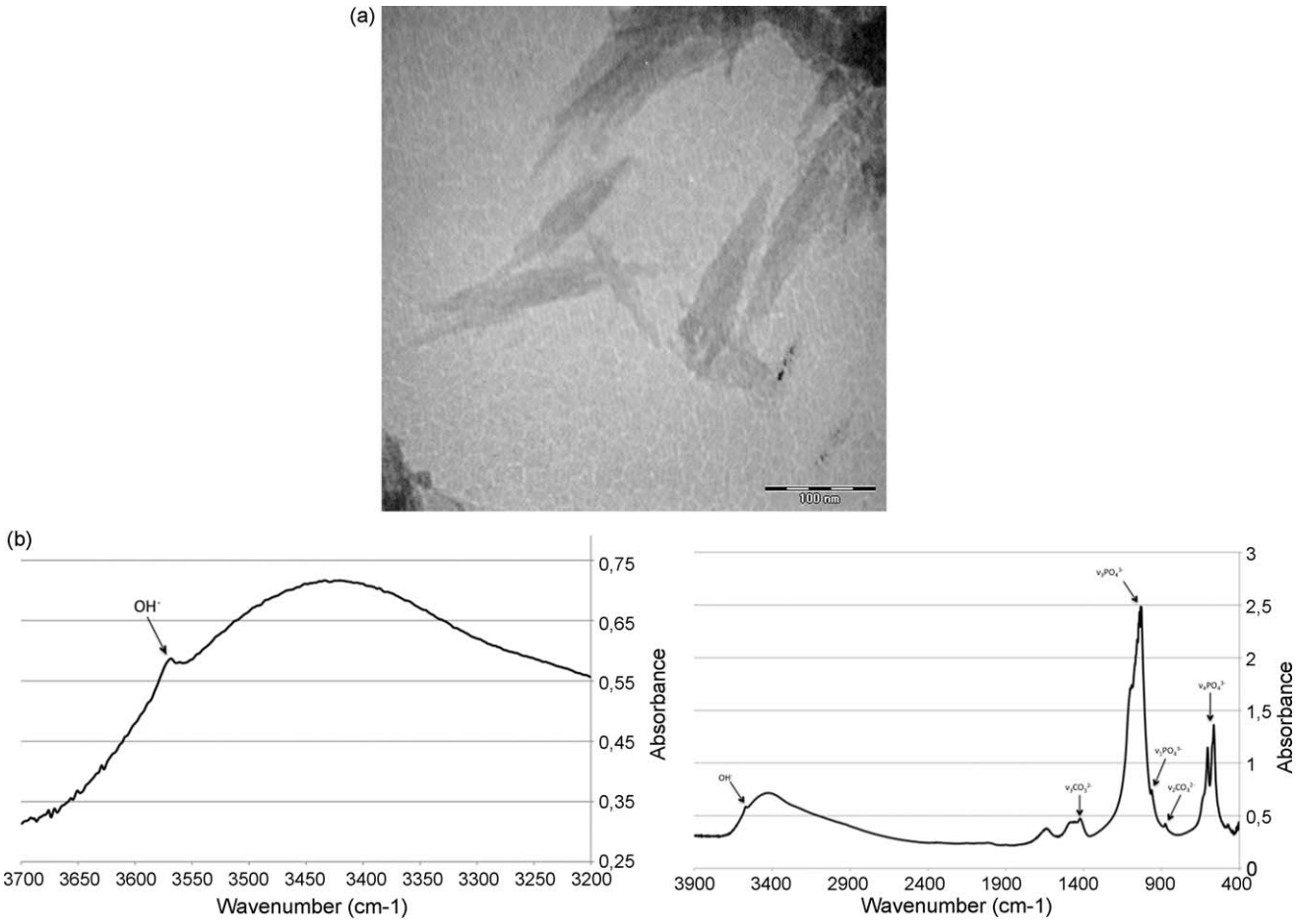


Fig. 1. a: transmission electron microscope observation of nHA crystallites; b: Fourier-transformed spectroscopy of nHA crystallites; c: X-ray diffraction of nHA powder; d: X-ray quantitative microanalysis performed on nHA crystallites revealing a Ca/P ratio of 1.67 (Cu, Cr, Si and O elements are due to observation conditions).

Author's personal copy

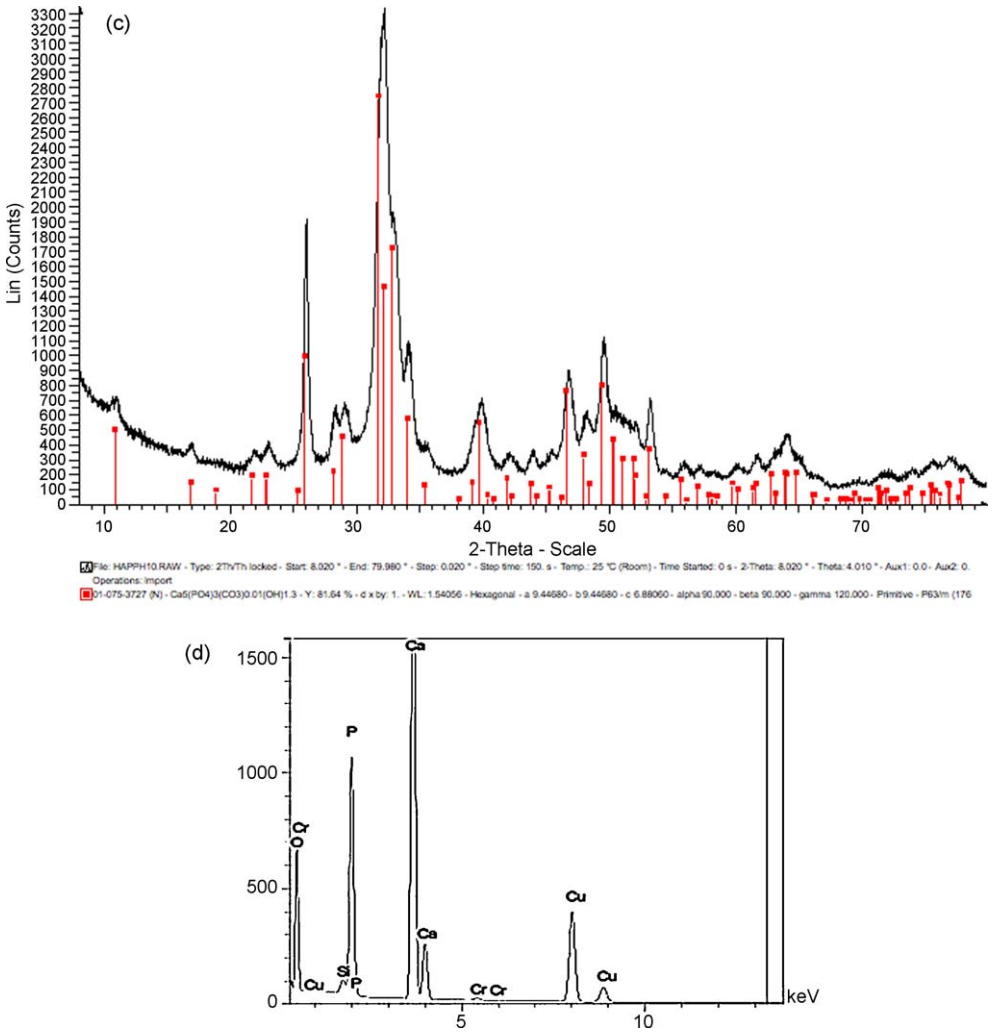


Fig. 1. (*Continued*).

1.67, which is characteristic of stoichiometric hydroxyapatite, it was also observed some carbonate groups at 1460 cm^{-1} and 880 cm^{-1}, and XRD pattern was compatible with carbonated hydroxyapatite. These carbonate substitutions of hydroxyl or phosphate groups appeared during wet chemical processing and are due to ambient carbon dioxide solubilization related to vigorous stirring. This modification of stoichiometric nHA is very common during *in vitro* synthesis and is similar to those present in natural bone. Although stoichiometric hydroxyapatite [Ca_{10} $(PO4)_6$ $(OH)_2$] is a model compound of biological mineralization, this formula is not actually found in calcified living tissues, which are mainly composed of non-stoichiometric apatite after carbonate substitution of hydroxyl groups. Recent studies on nano-hydroxyapatite structure revealed the presence of a hydrated layer on nHA surface, distinct from the apatite crystals proper, which is chemically unstable and confers the above-mentioned properties to nHA crystallites [21]. In the case of nHA sintering at high temperature (around 1000 °C), it has been previously demonstrated that this process tends to lower the SSA and to make more stable crystals, what prevent any resorption of this material *in vivo* [2]. Recently, low temperature sintering of nHA (around 150 °C) was used to increase mechanical features of the material, while keeping in the same time nHA surface properties (related to biological behaviour) [6].

In this study, nano-hydroxyapatite crystals were not sintered because the primary objective was to obtain a resorbable and highly bioactive material related high specific surface area (SSA) [22]. Another important reason to keep the material non sintered could be the production of composite materials, mixing nHA fine powder with a hydrogel. Numerous previous *in vitro* experiments on sintered nHA have shown that although this material is not resorbable, it possesses bioactive and osteoconductive properties [23]. In contrast, only few authors have studied biological properties of CDHA and LTA: Kasten et al. have shown that seeding and proliferative ability of HBMSc on CDHA was significantly higher than on ßTCP in vitro [5]. Our *in vitro* experiments have been performed using MG63 cell line to test nHA powder biocompatibility because of their osteoblastic-like phenotype. Results have shown first, that the material is biocompatible with MG63 osteoblastic-like cell lineage and second, that proliferation is related to initial cell concentration. Furthermore, early phenotypic marker alcaline phosphatase is maintained in presence of material.

Author's personal copy

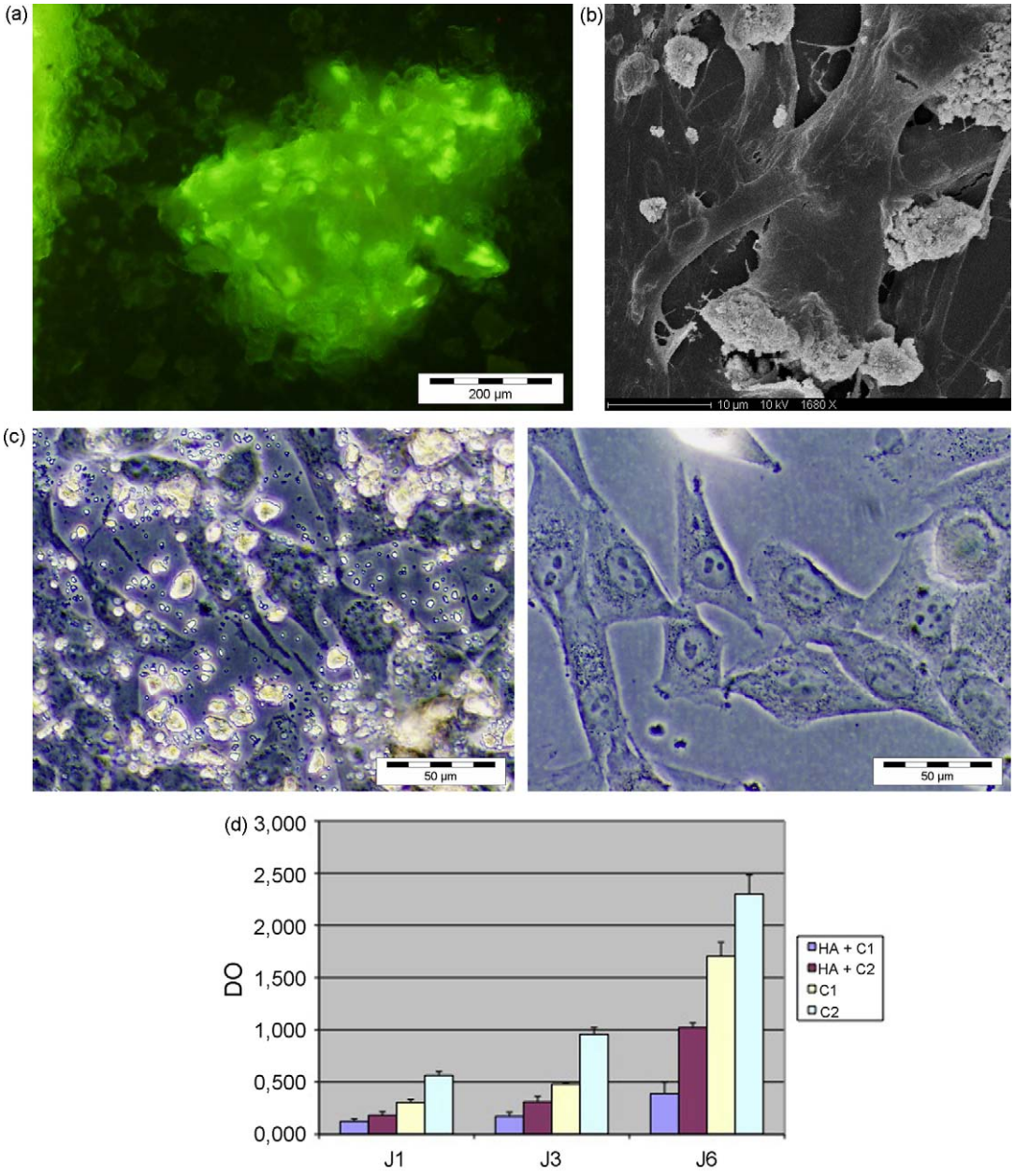


Fig. 2. a: live-dead assay on MG63 cells after 12 days of culture on nHA powder; b: scanning electron microscopy observation on MG63 cells after 12 days of culture on nHA powder; c: alcaline phosphatase (ALP) assay on MG63 cells after 3 days of culture on nHA powder (left). Positive control of ALP expressed by MG63 cells (right); d: MTT proliferation assay on MG63 cells after 1, 3 and 6 days of culture on nHA powder (C1: 20,000 cells/cm^2; C2:).

In vivo experiment was performed on eight mice, using a critical sized bone defect located on calvarial bone. This bone repair model allows a direct and reproducible access for surgery; furthermore, two lateral defects can be done on the same animal, thus providing one test and one negative control site. The main reported limitation of this model [24] is due to the poor mechanical constraints applied on this flat bone, however it was not the objective of this study to evaluate the mechanical properties of the material. Indeed, nHA powder has no mechanical properties and is not able to support excessive loads, so calvarial critical sized defect was chosen because it was adapted to this experiment.

The histological sections were observed for the presence of nHA, new bone formation and fibrous tissues. After 1 month, osteoid tissue was present in proximity to nHA in test sites and fibrous tissue was observed in control sites. After 3 months, newly formed bone was observed in test sites with a persistence of nHA crystallites. Control sites were still composed of fibrous tissue on decalcified sections, which confirmed that 4 mm wide bone defects on mice calvarial were of critical size [25,26]. These *in vivo* results displayed osteoconductive properties of the material after 1 month healing and absence of foreign body reaction around nHA crystallites. The use of nHA powder in vivo presents some limits related first, to the lack of mechanical

Author's personal copy

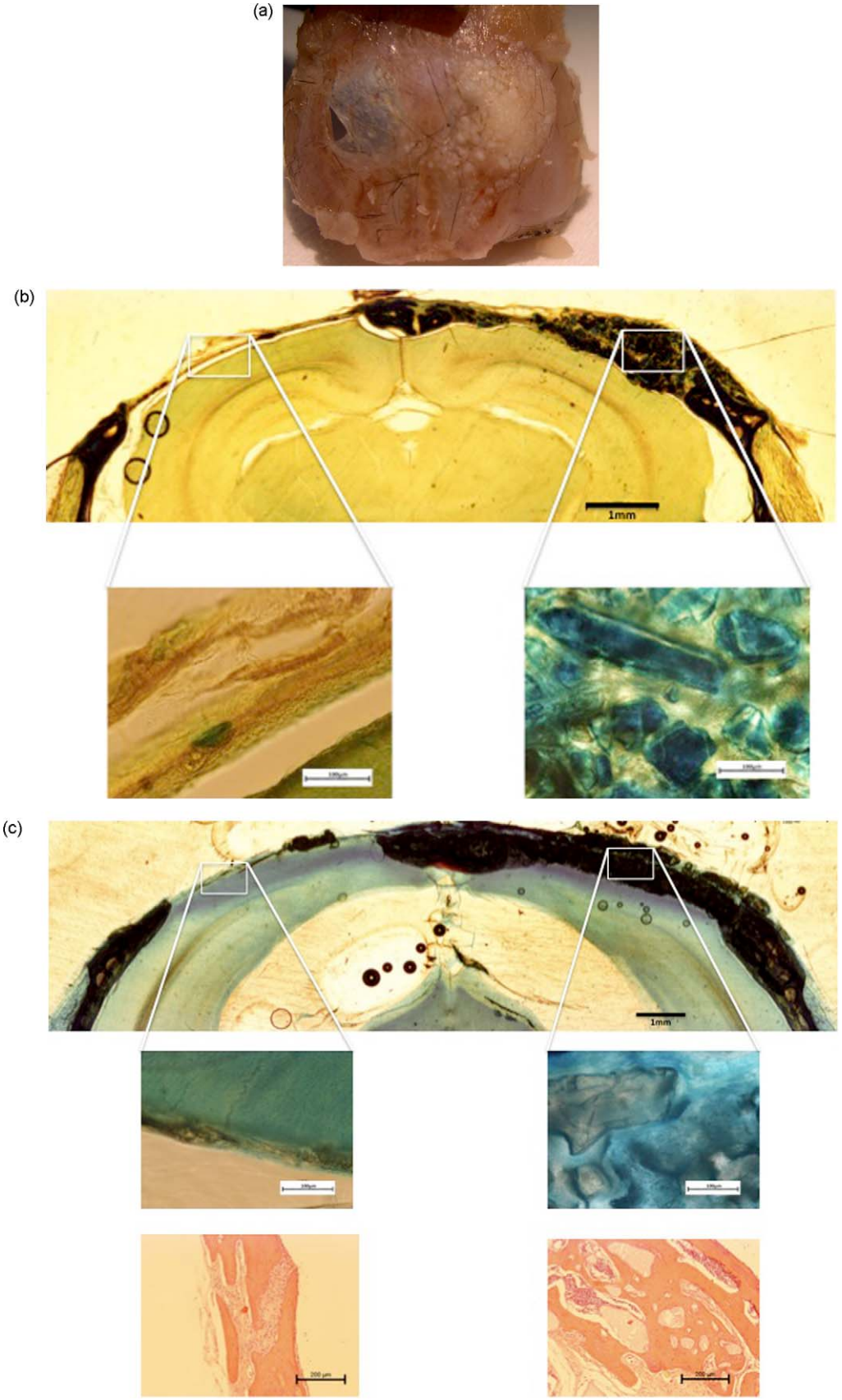


Fig. 3. a: macroscopic observation of OF-1 mice skull harvested after 1 month; b: undecalcified histologic sections obtained after 1 month; c: undecalcified histologic sections obtained after 3 months.

Author's personal copy

properties and second, to the possible diffusion of the nanoparticles out of the implantation site, and more generally in the whole animal through blood flow. To address these drawbacks, nHA powder could be implanted after blending it with an hydrogel solution: it could enhance mechanical properties and limit the eventual diffusion of nanoparticles [27].

5. Conclusions

This study exposed the synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering applications. Biological experiments have shown that this material is biocompatible with osteoblastic-like MG63 cells and possess osteoconductive properties. To improve bone mechanical properties of this material, future developments may consist in the synthesis of nHA in close contact to hydrogels.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Aquitaine Region and GIS advanced materials in Aquitaine for the financial support of the study and the CREMEM, Bordeaux 1 University for transmission electron microscopy observations.

References

[1] Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. J Bone Joint Surg Am 2008;90(Suppl. 1):36–42.
[2] Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. J Tissue Eng Regen Med 2007;1(4):245–60.
[3] Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. Biotechnol Prog 2009;25(6):1539–60.
[4] Oreffo ROC, Driessens CM, Planell JA, Triffitt JT. Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. Biomaterials 1998 Oct;19(20):1845–54.
[5] Kasten P, Luginbühl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Bohner M, et al. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite [beta]-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. Biomaterials 2003;24(15):2593–603.
[6] Drouet C, Bosc F, Banu M, Largeot C, Combes C, Dechambre G, et al. Nanocrystalline apatites: from powders to biomaterials. Powder Technol 2009;190(1-2):118–22.
[7] Agna Jr JWHCK, Alverson G. The mineral content of normal human bone. J Clin Invest 1958;37(10):1357–61.
[8] Cowin SC. Bone mechanics handbook. 2001.
[9] Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri MR, Sorrell CC. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. Mater Design 2003;24(3):197–202.
[10] Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, et al. Human interferon: mass production in a newly established cell line MG-63. Antimicrob Agents Chemother 1977;12(1):11–5.
[11] Wolf E, Röser K, Hahn M, Welkerling H, Delling G. Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1992;420(1):17–24.
[12] Saeri MR, Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Sorrell CC. The wet precipitation process of hydroxyapatite. Mater Lett 2003;57(24-25):4064–9.
[13] Tas CA. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 °C in synthetic body fluids. Biomaterials 2000;21(14):1429–38.
[14] Guo G, Sun Y, Wang Z, Guo H. Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse microemulsion. Ceram Int 2005;31(6):869–72.
[15] Gopi D, Govindaraju KM, Victor CAP, Kavitha L, Rajendiran N. Spectroscopic investigations of nanohydroxyapatite powders synthesized by conventional and ultrasonic coupled sol-gel routes. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2008;70(5):1243–5.
[16] Wei M, Ruys AJ, Milthorpe BK, Sorrell CC. Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles: effects of precipitation method on electrophoretic deposition. J Mater Sci Mater Med 2005;16(4):319–24.
[17] Bouyer E, Gitzhofer F, Boulos MI. Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. J Mater Sci Mater Med 2000;11(8):523–31.
[18] Ferraz MP, Mateus AY, Sousa JC, Monteiro FJ. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. J Biomed Mater Res A 2007;81(4):994–1004.
[19] Poinern GE, Brundavanam RK, Mondinos N, Jiang Z. Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. Ultrason Sonochem 2009;16(4):469–74.
[20] Grossin D, Rollin-Martinet S, Estournès C, Rossignol F, Champion E, Combes C, et al. Biomimetic apatite sintered at very low temperature by spark plasma sintering: physico-chemistry and microstructure aspects. Acta Biomater 2010;6(2):577–85.
[21] Rey C, Combes C, Drouet C, Sfihi H, Barroug A. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. Mater Sci Eng C 2007;27(2):198–205.
[22] Kasten P, Vogel J, Beyen I, Weiss S, Niemeyer P, Leo A, et al. Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference. J Biomater Appl 2008;23(2):169–88.
[23] Li B, Chen X, Guo B, Wang X, Fan H, Zhang X. Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure. Acta Biomater 2009;5(1):134–43.
[24] Muschler G, Raut VP, Patterson T, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. Tissue Eng Part B 2009.
[25] Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fang TD, Fong KD, et al. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. Plast Reconstr Surg 2004;114(3):713–20.
[26] Gupta DM, Kwan MD, Slater BJ, Wan DC, Longaker MT. Applications of an athymic nude mouse model of nonhealing critical-sized calvarial defects. J Craniofac Surg 2008;19(1):192–7.
[27] Durucan C, Brown P. Biodegradable hydroxyapatite-polymer composite. Adv Eng Mat 2001;3(4):227–31.

Biomaterials 31 (2010) 7250–7256

Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials

Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization

Bertrand Guillotin [a,*], Agnès Souquet [a], Sylvain Catros [a], Martí Duocastella [b], Benjamin Pippenger [a], Séverine Bellance [a], Reine Bareille [a], Murielle Rémy [a], Laurence Bordenave [a], Joëlle Amédée [a], Fabien Guillemot [a]

[a] INSERM U577 Biomaterials and Tissue Repair, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, zone Nord, Bâtiment 4a, 2ème étage, 33076 Bordeaux cedex, France
[b] Universitat de Barcelona, Departament de Física Aplicada i ÒpticaMartí i Franquès 1, 08028-Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 April 2010
Accepted 21 May 2010
Available online 2 July 2010

Keywords:
Tissue engineering
Laser assisted bioprinting
Laser manufacturing
Rapid prototyping
Micropatterning
High cell density printing

ABSTRACT

Over this decade, cell printing strategy has emerged as one of the promising approaches to organize cells in two and three dimensional engineered tissues. High resolution and high speed organization of cells are some of the key requirements for the successful fabrication of cell-containing two or three dimensional constructs. So far, none of the available cell printing technologies has shown an ability to concomitantly print cells at a cell-level resolution and at a kHz range speed. We have studied the effect of the viscosity of the bioink, laser energy, and laser printing speed on the resolution of cell printing. Accordingly, we demonstrate that a laser assisted cell printer can deposit cells with a microscale resolution, at a speed of 5 kHz and with computer assisted geometric control. We have successfully implemented such a cell printing precision to print miniaturized tissue like layouts with *de novo* high cell density and micro scale organization.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biological tissues are composed of multiple components in close interactions with each other: different cell types, each embedded in their specific extracellular matrix and with blood capillaries nearby. Cells are often in physical contact with each other, which allows complex interactions which support homeostasis. The development of strategies to reproduce the functional anisotropy of living tissue remains a puzzling challenge for tissue engineers. The winning strategy may address precise organization of different cell types embedded in cell type specific ECM with specific growth factors, cell adhesion proteins and specific mechanical properties.

Parallel to the scaffold based strategy involving cell seeding onto porous structures, the bioprinting approach aims at building three dimensional biological structures or functional organs, layer-by-layer, from the bottom up [1,2]. Jet-based methods to print living cells have been reviewed previously [3,4]. Among them, the Laser Induced Forward Transfer (LIFT) technique allows printing inorganic as well as organic material with micrometer resolution. Initially developed to transfer metals [5], the LIFT has been successfully modified to print biological material such as peptides, DNA, and cells [6–8]. A LIFT based bioprinter designed to print biological material was created and named BioLP (Biological Laser Printer) by Barron et al. [9]. LIFT based bioprinters or Laser Assisted Bioprinters (LAB) are comprised of three components [3]: (i) a pulsed laser source, (ii) a target, or ribbon, from which a biological material is printed, and (iii) a receiving substrate that collects the printed material. In brief, the ribbon is made of a thin absorbing layer of metal (such as gold or titanium) coated onto a laser transparent support (*i.e.* glass). Organic material (molecules or cells) is prepared in a liquid solution (*i.e.* culture media), and deposited at the surface of the metal film. The laser pulse induces vaporization of the metal film, resulting in the production of a jet of liquid solution which is deposited onto the facing substrate [1,10].

The highest resolution of cell printing could be defined as a continuous line-up of cells, in which successive cells are printed one by one at desired coordinates, and in contact with each other. Such a micro scale cell printing resolution implies that the cell fraction of each printed droplet should tend to 100%.

Considering the LAB, the resolution of printing, i.e. the size and proximity of the printed droplets, depends on parameters like the

* Corresponding author. Tel.: +33 557579273; fax: +33 556900517.
E-mail addresses: bertrand.guillotin@inserm.fr (B. Guillotin), agnes.souquet@inserm.fr (A. Souquet), sylvaincatros@hotmail.com (S. Catros), marti_duocastella@ub.edu (M. Duocastella), benpippenger@hotmail.com (B. Pippenger), severine.bellance@gmail.com (S. Bellance), reine.bareille@inserm.fr (R. Bareille), murielle.remy@u-bordeaux2.fr (M. Rémy), laurence.bordenave@biophys.u-bordeaux2.fr (L. Bordenave), joelle.amedee@inserm.fr (J. Amédée), fabien.guillemot@inserm.fr (F. Guillemot).

0142-9612/$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.055

thickness of the layer of the bioink coated onto the ribbon, the surface tension and the viscosity of the bioink, the wettability of the substrate, the laser fluence, the air gap between the ribbon and the substrate [1]. The compromise between these parameters in order to obtain the desired resolution of printing may thus vary depending on the type of material being printed. The influence of these parameters on jet formation is still under investigation [11,12]. Therefore, controlled cell printing (*i.e.* absence of splashing, controlled size of the liquid droplet) by LAB remains challenging and the highest resolution of cell printing has not yet been attained.

According to the bioprinting approach, the resolution counterbalances the volume criterion [13]. For a given volume to fabricate, given a constant printing speed, increasing the organization of the said volume would be more time consuming. Particular attention should then be brought to the printing speed, when high throughput production of a micro scale resolution material is desired. For this reason, our experiments were all performed using a laser pulse repetition rate $f = 5$ kHz.

Our objective was i) to study the effect of viscosity, cell density, laser energy and laser printing speed to attain the highest resolution of cell printing at $f = 5$ kHz, ii) to use this high resolution of cell printing to print a tissue-like interface in one sequence of multiple cell type printing, and iii) to implement high resolution of cell printing into tissue fabrication by laser printing.

2. Material and method

2.1. Laser-assisted bioprinter

The laser-assisted bioprinting workstation has been described previously [13]. Briefly, the laser source is a solid Nd:YAG crystal laser (Navigator I, Newport Spectra Physics, 1064 nm wavelength, 30ns pulse duration, 1–100 kHz repetition rate, 7 W mean power). A large field optical F-theta lens (58 mm focal length, S4LFT, Sill Optics, France) is used to focus the laser beam onto the titanium film surface. The laser beam is driven by a scanning system composed of two galvanometric mirrors (SCANgine 14, ScanLab), with a scanning speed reaching 2000 mm/s. A 5-axis carousel system has been integrated into the workstation (NovaLase, S.A., Canéjan, France) with the purpose of printing multi-color patterns. Substrate positioning, carousel driving, video observation and pattern designs are monitored with dedicated software. The transfer process was performed in air, at room temperature, with a distance of 400 μm between the ribbon and the substrate. Glass slides were used as substrate. Depending on the experiment, cells were printed directly onto the glass slide, or on a 100 μm thick layer of a solution of 90 mg/ml fibrinogen (see below). All experiments were performed using a repetition rate of 5 kHz. The laser energy deposit can be modulated by tuning the laser power (6–80 mW) or the diaphragm aperture stop (5–18 mm).

2.2. Cell line

Rabbit carcinoma cell line B16, and Human umbilical vein endothelial cell line Eahy926 were cultured on plastic dishes in Iscove modified Dulbecco's medium (IMDM, GIBCO, Life Technologies, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Boehringer, Mannheim, Germany), in a controlled atmosphere (5% CO_2, 100% humidity, 37 °C).

2.3. Bioink preparation

Cells were suspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Depending on the experiment, this cell suspension was supplemented with varying concentration of glycerol (v/v) and varying concentration of sodium alginate (w/v; Protanal 10/60 – FMC BioPolymer), or with Matrigel™ (see below), or with a solution of thrombin (see below).

2.4. Viscosity measurement

The viscosity of different bioinks was measured with a controlled stress rheometer (AR1000, TA instruments).

2.5. Ribbon preparation

A 50 nm thick titanium film was deposited under vacuum on a glass slide with a Peltier cooled sputter coater (K575X, Emitech). Three micro litters of bioink per cm^2 were spread onto the metal film using a blade coater (3570 Elcometer).

2.6. Tissue fabrication into Matrigel™

Matrigel was purchased from BD Biosciences. It was diluted in DMEM to a final concentration of 4 mg/ml to resuspend cells or to be served as 100 μm thick substrate onto the glass slide.

2.7. Tissue fabrication into fibrin hydrogel

Tissucol Kit (Baxter) has been prepared according to manufacturer's instructions. A solution of thrombin (250 UI) and $CaCl_2$ (40 mM) was used 1:1 to resuspend cells in order to make a bioink with a cell concentration of $5 \cdot 10^7$ to 10^8 cells/ml. A fibrinogen solution was prepared at a concentration of 90 mg/ml and served as a 100 μm thick substrate onto the glass slide.

2.8. Cell viability

Cell viability was assessed 24 h post printing using live/dead assay (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

2.9. Image analysis

Ribbon and substrate were observed after each printing experiment with a Nikon Optiphot-2 inversed optical microscope equipped with a Sony PowerHAD 3CCD color video camera driven by Matrox Intellicam software, or with a Nikon Eclipse 80i equiped with a motorized stage. Blind 3-D deconvolution with 15 iterations was performed on the z-stack pictures with Autoquant 2.2.0 software. Three-dimensional reconstruction with surface mode was performed with Imaris 7.0.0 software.

3. Results

3.1. Viscosity and laser energy deposit influence the printing resolution

The viscosity of different bioinks is shown in Table 1. Forty million cells/ml adds 20% of the viscosity to a 1% (w/v) alginate solution. Results in Table 2 show that the ejected droplet diameter onto the substrate is correlated to the viscosity of the bioink and the laser energy deposit. The higher the viscosity and/or the lesser the energy deposit, the smaller the droplet diameter will be. It is possible to achieve similar resolution, *i.e.* similar droplet size, with a 0.1% (w/v) alginate bioink printed with a laser pulse energy of 6 μJ (droplet size: 49 ± 3.5 μm), and with a 1% alginate (w/v) bioink printed with a pulse energy of 12 μJ (droplet size: 51 ± 4.2 μm). These results show that the printing resolution depends on the bioink viscosity and the laser energy deposit.

3.2. High cell concentration for high cell printing resolution

The effect of the cell suspension viscosity on printing resolution was addressed. Cell suspensions supplemented with or without 1% (w/v) alginate were compared (Fig. 1). Cells were printed at a concentration of 50 million cells/ml, according to the pattern of the Olympic flag. Results show some splashing in the absence of alginate (Fig. 1a). In the presence of 1% (w/v) alginate, splashing is reduced (Fig. 1b). One percent alginate increased the solution viscosity up to 100 mPa s. With such a viscosity, splashing of the bioink onto the substrate is reduced, and the resolution of the printed pattern is increased.

Table 1
Viscosity of culture media supplemented with alginate, glycerol, and cells. Glycerol is added into the bioink to prevent evaporation. The cell model used in this experiment is the rabbit carcinoma cell line B16, at a concentration of $4 \cdot 10^7$ cells/ml. Experiment was carried on at 10 °C.

Solution in culture media (DMEM)	Vicosity (mPa s)
Alginate 0.5% w/v; glycerol 30% v/v	50
Alginate 1% w/v	100
Alginate 1% w/v; glycerol 30% v/v	110
Alginate 1% w/v; $4 \cdot 10^7$ cells/ml	120

Table 2
Diameter of the ejected droplet onto the glass substrate, depending on alginate concentration in the bioink, and laser energy (μJ). The different bioinks were composed of mQ water supplemented with 30% (v/v) glycerol, with varying concentration of alginate. c: coalescence of contiguous droplets onto the substrate. n.t.: no transfer of the bioink onto the substrate.

Alginate	4.5 μJ	6.0 μJ	7.5 μJ	9.0 μJ
0.1%w/v	49 ± 3 μm	69 ± 3 μm	c	c
0.5% w/v	38 ± 3 μm	55 ± 5 μm	64 ± 5 μm	62 ± 6 μm
1.0% w/v	n.t.	48 ± 4 μm	46 ± 3 μm	51 ± 4 μm

Different laser parameters were tested on two cell concentrations: 50 million cells/ml and 100 million cells/ml (Fig. 2). Using 18 or 11 mm diaphragm (D) and 16 μJ energy (E), the printed droplets coalesced onto the substrate and formed a continuous line of bioink. Decreasing laser energy deposit by using a $D = 5$ mm and $E = 16$ μJ, the printed droplets were smaller and remained individualized. The higher the energy deposited, the wider the printed cell line would become. As a result, bigger droplets were printed in which cells were more likely to be dragged off by draining/capillary effect (Fig. 2, upper left panel, $D = 18$–11 mm). At $5{\cdot}10^7$ cells/ml with $D = 5$ mm and $E = 16$ μJ, some droplets were printed without a cell (Fig. 2, upper left panel, diaphragm aperture stop $D = 5$ mm). With cell concentration of 10^8 cells/ml, at least one cell was present in each printed droplet (Fig. 2, upper right panel, $D = 5$ mm), thus increasing cell printing resolution. No printed droplet was observed using $D = 5$ mm in combination with $E = 8$ μJ.

3.3. Cell printing resolution according to the laser scanning speed

We have studied the effect of the laser scanning speed on the cell printing resolution. Cells were prepared at a concentration of 10^8 cells/ml in culture medium. At 1600 and 800 mm/s, consecutive droplets were individualized and distant from 300 and 160 μm respectively, as anticipated (Fig. 3a). At 400 and 200 mm/s, the distance between printed droplets was seemingly shorter. We did not see any resolution improvement between 200 and 100 mm/s (Fig. 3a,b). The results at 1600 and 800 mm/s show that each printed droplet contained at least one cell (Fig. 3b). In these experimental conditions, we found the best resolution of cell printing was achieved using a scanning speed of 200 mm/s.

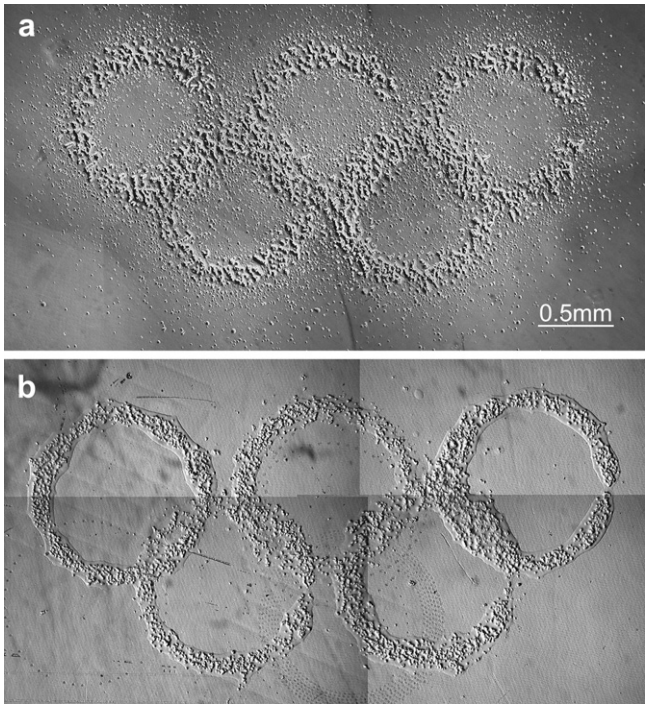


Fig. 1. Cellularized 2D pattern resolution according to viscosity. Fifty million cells per ml were suspended in DMEM supplemented with 10% glycerol (a), plus 1% (w/v) alginate (b). Satellite droplets (splashing) are virtually absent when 1% (w/v) alginate is added to the bioink. Phase contrast microscope image of cells printed onto glass. Magnification 25×.

3.4. High spatial resolution allows precise multi cell type spatial arrangement

Fig. 4 illustrates the multi-color printing capability of the LAB. Two distinct suspensions of cells (human endothelial cell lineage Eahy 926, 60 million cells/ml) were sequentially printed in 2 dimensions according to a pattern of two concentric circles (Fig. 4a). The inner circle was printed first using a suspension of cells loaded with green fluorescent calcein (Fig. 4b). Secondly, the outer circle was printed using a suspension of cells loaded with red fluorescent Dil-LDL (Fig. 4c). Differential staining of the cells revealed the two circles overlapped, which was likely due to bioink coalescence between the two circles. This experiment shows that different cell types can be printed in close contact to each other, with a high cell concentration, according to a desired spatial organization.

3.5. LAB application to living tissue fabrication

We used the LAB to print a stable soft free form structure with a resolution compatible with microvasculature dimensions (Fig. 5). A solution of fibrinogen (90 mg/ml) was served as biopaper onto the glass substrate. The ribbon was loaded with a bioink made of a solution of thrombin and $CaCl_2$ (250 UI and 40 mM respectively). The bioink was then printed onto the fibrinogen according to a network of parallel and perpendicular lines (dimension: 2×2 cm, pitch: 500 μm). With laser scanning speed set at 200 mm/s, this 4 cm^2 pattern was printed in a couple of seconds.

This result was reproduced using the same bioink supplemented with Eahy926 endothelial cell line ($6{\cdot}10^7$ cells/ml). The cell containing bioink was printed according to a matrix of parallel lines (Fig. 6a). A live/dead assay staining was performed 24 h after the printing experiment (Fig. 6c). Virtually all the printed cells concentrated calcein and excluded ethidium homodimer, and were thus considered viable. The distribution of the printed cells embedded in the fibrin pattern was measured within a depth of 100 μm into the fibrinogen layer (Fig. 6d). Similar experiment has been reproduced using 4 mg/ml Matrigel into the bioink and as a 100 μm thick substrate (not shown).

4. Discussion

We have demonstrated that cells can be printed at a microscale resolution and at a high speed: a 10^8 cells/ml concentrated bioink, with a viscosity of at least 120 mPa s can be processed by the LAB to print cells almost one by one, next to each other. Because the printing speed is also critical for living tissue fabrication [13], we have performed all of our experiments using a laser pulse repetition rate of 5 kHz. In our experiments, the laser energy deposit needed to be tightly adjusted with respect to the viscosity and the cell concentration of the bioink. Accordingly, a wide range of extracellular matrices, characterized by as many different viscosities (within the range studied) can be printed at a similar resolution. This is in agreement with previously described mechanism of bioink droplet ejection (see [1] for a review). Thanks to this

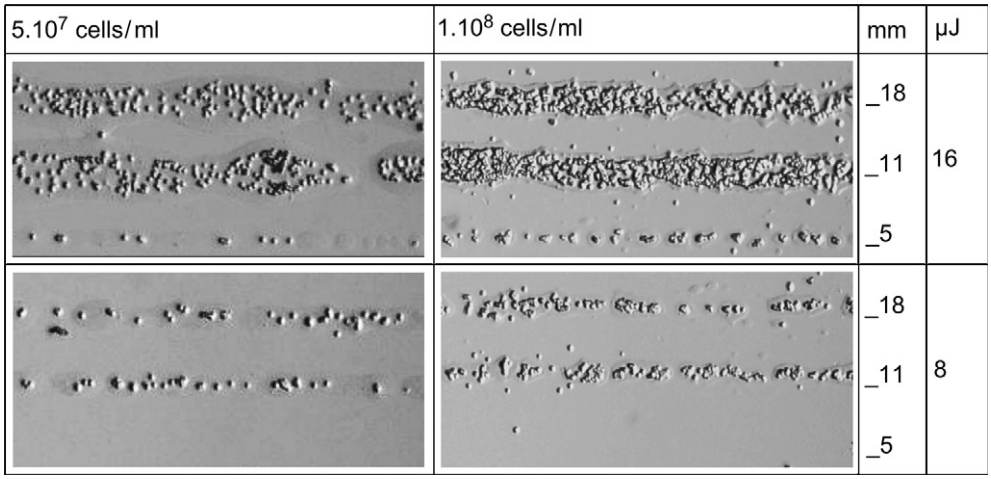


Fig. 2. Cell printing resolution according to the cell concentration of the bioink (DMEM, 1% aginate (w/v), 5% glycerol), the diaphragm aperture stop (mm) and the laser energy deposit (µJ). Phase contrast microscope image of cells printed onto glass. Magnification 25×.

microscale resolution, we have fabricated high cell density tissue like constructs with micro scale organization.

The high printing resolution of liquids achieved by LAB has been demonstrated [7,10,14]. It is well established that cells can be printed using the LAB. To achieve microscale cell printing precision, cells should be printed with a minimal volume of surrounding ECM (or bioink). However, cell printing is statistic [15,16]. The presence of a single cell in each printed droplet is challenged by the use of a bioink with a low cell concentration (e.g. $5 \cdot 10^7$ cells/ml in our hands). We hypothesized that the LAB should be able to print cells one by one, next to each other. We have adjusted the cell concentration onto the ribbon, the laser parameters according to the viscosity of the bioink, so that cells were printed within a droplet volume as small as possible. Inkjet printers and plotters are able to print cells and sub millimeter sized objects (e.g. cell aggregates [17]). Regarding cell printing, some limitations have been described like printer head clogging issues due to cell concentration of the bioink superior to 10^7 cells/ml. We have demonstrated that the LAB can print a high cell fraction per droplet volume (*i.e.* cells with little surrounding bioink volume). Accordingly, the LAB can print cells one by one from a high cell concentration bioink (10^8 cells/ml), to fabricate a tissue engineered product with comparable organization and cell density with living tissues in which cells are in physical contact with each other. Further development may focus on the implementation of a cell recognition scanning technology onto the ribbon prior to printing, so that the laser beam could exactly aim one single cell per pulse.

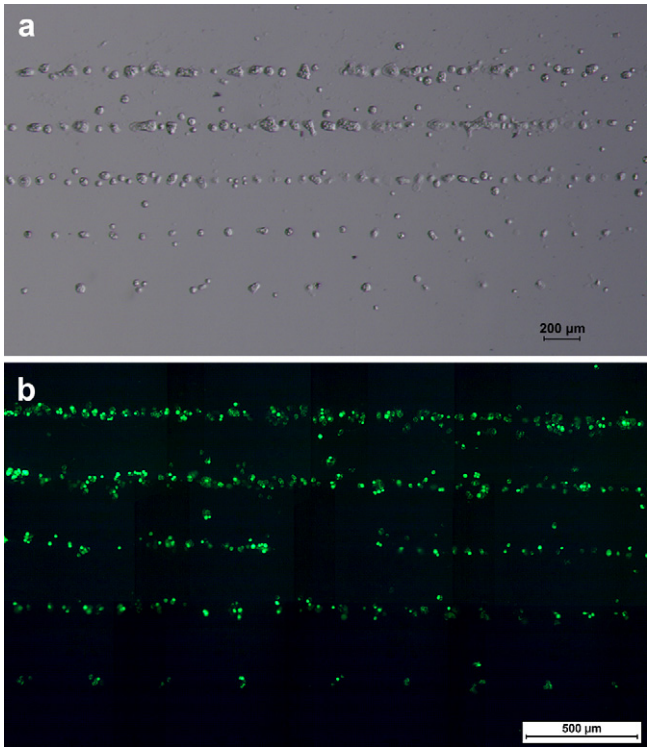


Fig. 3. Cell printing resolution according to the laser scanning speed. Hundred million cells per ml loaded with green fluorescent Calcein-AM (4 µM) were prepared in DMEM. Cells were printed according to five parallel lines of varying scanning speed (from top to bottom): 100; 200; 400; 800 and 1600 mm/s (with laser parameters set at $E = 6$ µJ, $D = 11$ mm). (a) Phase contrast microscope image of cells printed onto glass. Scale bar: 200 µm. (b). Fluorescence microscope image of cells printed onto a 100 µm thick layer of Matrigel. Scale bar: 500 µm.

The LAB requires cells to be in a liquid suspension prior to being printed onto the substrate. Moreover, ECM is crucial for cell homeostasis *in vivo*. The cell containing bioink should be composed of an ECM fraction accordingly. Consistent with the layer-by-layer 3D building strategy, the solidification of the bioink onto the substrate is necessary and should be controlled for at least three reasons i) to stabilize the printed 2D pattern, ii) to mechanically support the subsequent bioink layer, iii) to mimic cell type specific extracellular matrix (ECM) with the ability to regulate cell fate [18]. The solidification process of the bioink should not be harmful to the cells. We have supplemented the cell containing bioink with 1% (w/v) alginate hydrogel as a preliminary approach to mimic extracellular matrix. Cell adhesion proteins have been printed successfully since Klebe pioneering work [19,20]. Fibrin is a versatile biopolymer, which presents potential for tissue engineering applications [21]. Cui et al. have recently printed a cellularized pattern reminiscent of microvasculature using an inkjet bioprinter to print cells in combination with fibrin hydrogel [22]. Within the conditions used, a proliferation time of 3 weeks was needed to obtain an endothelium like cell density according to the printed pattern. Printing specificities of inkjetting have been studied previously. To our knowledge, the fastest technology used for a cell printing experiment was 1 kHz using a piezo electric (single printer head) inkjet bioprinter [15], and the highest cell concentration used was 5 million cells/ml [23]. By combining on demand solidification of the printed hydrogel with the high cell printing resolution of the

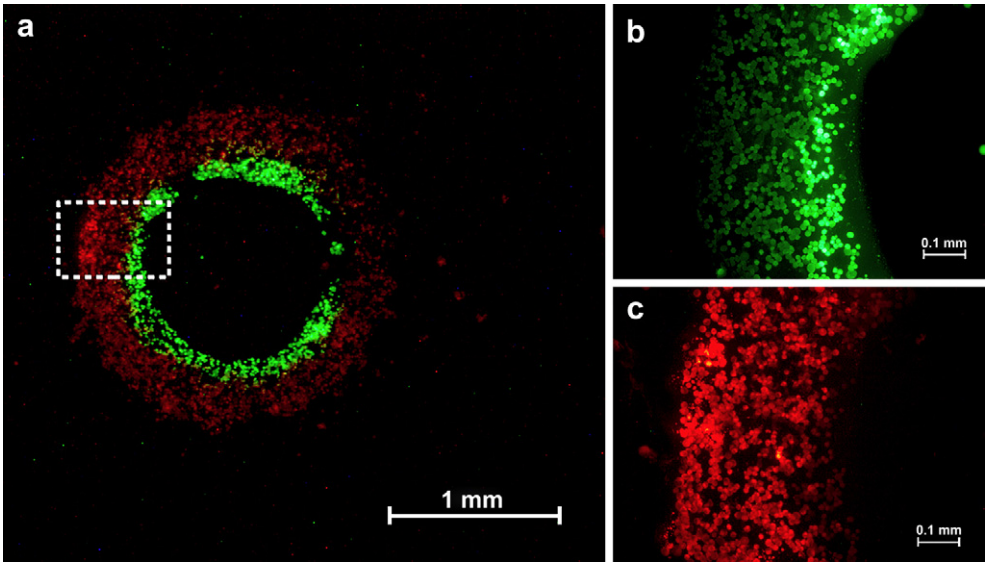


Fig. 4. Sequential two color cell printing in 2D. Human endothelial cell line (Eahy926) was loaded with 4 μM of green fluorescent Calcein-AM, or with 2 μg/ml of red fluorescent Dil-LDL prior to the experiment. (a) The two cell suspensions ($6 \cdot 10^7$ cells/ml in DMEM, supplemented with 1% (w/v) alginate were then printed according to a pattern of concentric circles). The two cell suspensions were each blade coated onto two separate ribbons. Both ribbons were placed onto the wheel distributor of the LAB. Calcein loaded cell suspension was used to print the inner circle (1.2 mm diameter). Dil-LDL loaded cell suspension was used to print the outer circle (1.6 mm diameter). (b) Green Calcein stained cells within the region of interest as defined in 4a (dashed rectangle). (c) Red fluorescent Dil-LDL stained cells within the same region of interest. The overlay of Fig. 4b and c shows the two circles partially overlap due to the coalescence of their interface.

LAB as demonstrated herein, we were able to engineer a tissue-like structure with *de novo* high cell density and cell level (microscale) organization. This approach aims at stabilizing cells within a CAD/CAM pattern, and is complementary to bioprinting approach on some homogenous biopaper (i.e. Matrigel) on which random cell migration is allowed [24]. Also, *de novo* high density is required for tissue engineering when using differentiated cells with limited to no potential for proliferation.

Manufacturing of biological structures offers new resources for tissue engineering [25]. Needs for cellular microarrays and high throughput screening techniques have been reviewed [26]. Cell microchips are already available [27], or operational for data production [28,29]. Also, cell sorting technologies with single cell resolution has been reported [30]. Geometrically controlled deposit of cells can be achieve with very high precision based on dielectrophoretic forces, but extracellular matrix (ECM) deposit can not be controlled by this technology [28]. General needs that a cell microarrayer should fulfill are: fast micro array production, exact controllability of spot position and volume, cost effective production process, and flexibility of printing regarding array layout, microscaling capability (*i.e.* printing resolution) and versatility of bioink properties (viscosity, cell concentration). These concerns are addressed by the LAB which can process cell concentration (at least 10^8 cells/ml) and viscosity (above 100 mPa s) higher than currently available inkjet bioprinters [3,31]. Such capability allows printing more cells in smaller volumes, with higher level of organization [16,32]. We have shown in this study that the LAB complies with at least two requirements which make it a cell manipulator at micron length scale: 1) it overcomes the traditional trade-off between throughput and positional control, and 2) it is an easy-to-use

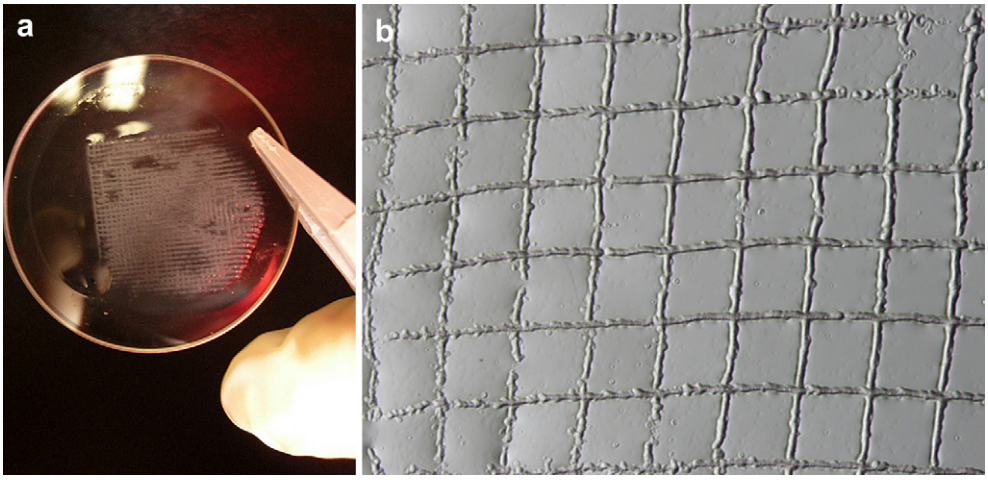


Fig. 5. Geometrically controlled soft free form bioprinting. The bioink composed of thrombin (250 UI) and $CaCl_2$ (40 mM) has been printed onto a layer of fibrinogen (90 mg/ml), according to a computer designed matrix of parallel and perpendicular lines (2 cm length, 500 μm pitch). (a) Photograph of the fibrin pattern, scale 1:1. (b) Fibrin pattern observed with a phase contrast optical microscope, magnification 25×.

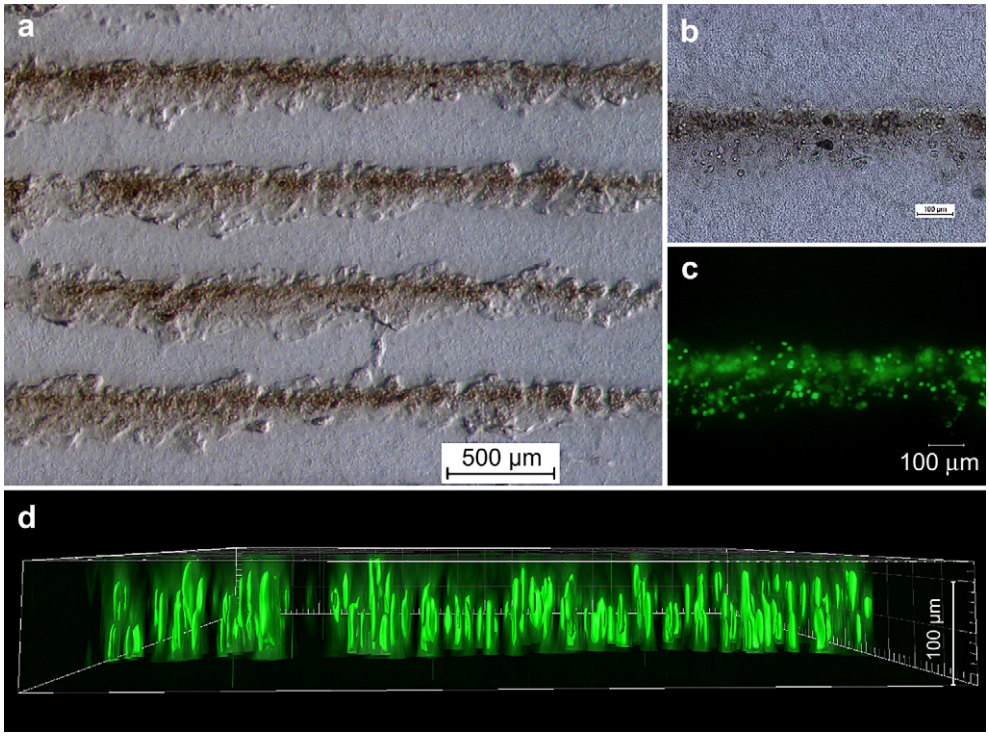


Fig. 6. Geometrically controlled cellularized soft free form bioprinting. Endothelial cell line Eahy926 has been added to the bioink (as detailed in Fig. 5) at a concentration of 6 10^7 cells/ml. The cell containing bioink was then printed on a layer of fibrinogen (90 mg/ml), according to computer designed parallel lines (2 cm in length, 500 µm pitch). (a) Phase contrast optical microscope image, scale bar: 500 µm. (b) Phase contrast optical microscope image, scale bar: 100 µm. (c) Live/dead assay staining of Fig. 6b, fluorescence microscope image, scale bar: 100 µm. (d) Orthogonal view of the surface representation of the z-stack of Fig. 6c.

printer that does not require material or cell functionalization [33]. Also, LAB could be integrated into a versatile laser based CAD/CAM system, associating photolithography [34], photo polymerization [35,36], machining, sintering and foaming [37]. All these abilities are suitable for meeting the demand for miniaturization and layout precision for cellular microarray or tissue engineering [31].

Previous studies have shown that LAB allows to print undamaged mammalian cells in terms of viability, DNA damage and function [32,38–41]. The compatibility of our LAB prototype with cell viability has been shown previously [13]. We are currently investigating the functional integrity of the printed cells. Koch et al. have shown that potential deleterious effect of a similar LAB device on printed cells is below detection, if not absent [42].

5. Conclusion

The LAB can print versatile biological patterns such as cell clusters, cell confluent surface and cell alignments according to computer-aided design. Also, a cell-level resolution of cell printing at a high speed (5 kHz) is achievable by this laser assisted bioprinter. Such precision and speed were a prerequisite to apply the LAB to cellularized tissue fabrication. We have shown that printable extracellular matrix and cells can be combined in a laser assisted printing sequence to fabricate a stable and organized soft free form tissue, which can host a high cell density *de novo*. While currently under investigation, control of three-dimensional cell printing strategies should bring LAB to operational maturity in the field of soft free form tissue engineering.

Acknowledgments

The authors gratefully thank Eric Laurichesse (Centre de Recherche Paul Pascal, University of Bordeaux 1) for assistance with rheology experiments and Stéphanie Lesage for useful talks, to Nicolas Egon (Novalase) for technical support with the laser workstation, to Sébastien Marais for image analysis and to Jean-Christophe Fricain for critical review of the manuscript. M. Duocastella acknowledges funding by MCI of the Spanish Government (Projects MAT2007-62357 and CSD2008-00023), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). This study was supported by fundings from GIS "Advanced Materials in Aquitaine" and Région Aquitaine.

Appendix

Figures with essential colour discrimination. Figs. 3–6 in this article have parts that are difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the online version, at doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.055.

References

[1] Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters vs. cell fate, and perspectives in tissue engineering. Nanomedicine 2010;5:507–15.
[2] Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends Biotechnol 2003;21:157–61.
[3] Ringeisen BR, Othon CM, Barron JA, Young D, Spargo BJ. Jet-based methods to print living cells. Biotechnol J 2006;1:930–48.
[4] Guillemot F, Mironov V, Nakamura M. Bioprinting is coming of ages. Biofabrication 2010;2: 2010. 010201.
[5] Bohandy J, Kim BF, Adrian FJ. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. J Appl Phys 1986;60:1538–9.
[6] Chrisey DB. Materials processing: the power of direct writing. Science 2000;289:879–81.
[7] Colina M, Serra P, Fernández-Pradas J, Sevilla L, Morenza J. DNA deposition through laser induced forward transfer. Biosens Bioelectron 2005;20:1638–42.
[8] Dinca V, Kasotakis E, Catherine J, Mourka A, Ranella A, Ovsianikov A, et al. Directed three-dimensional patterning of self-assembled peptide fibrils. Nano Lett 2008;8:538–43.

[9] Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. Biomed Microdevices 2004;6:139–47.
[10] Serra P, Duocastella M, Fernandez-Pradas JM, Morenza JL. Liquids microprinting through laser-induced forward transfer. Appl Surf Sci; 2009:255.
[11] Duocastella M, Fernandez-Pradas J, Morenza JL, Serra P. Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids. J Appl Phys 2009;106: 2009. 084907.
[12] Lin Y, Huang Y, Chrisey DB. Droplet formation in matrix-assisted pulsed-laser evaporation direct writing of glycerol-water solution. J Appl Phys 2009;105:093111–6.
[13] Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B, Lopez J, Faucon M, et al. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. Acta Biomater 2010;6:2494–500.
[14] Dinca V, Ranella A, Popescu A, Dinescu M, Farsari M, Fotakis C. Parameters optimization for biological molecules patterning using 248-nm ultrafast lasers. Appl Surf Sci 2007;254:1164–8.
[15] Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. Tissue Eng Part A 2005;11:1658–66.
[16] Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR. Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. Ann Biomed Eng 2005;33:121–30.
[17] Norotte C, Marga FS, Niklason LE, Forgacs G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. Biomaterials 2009;30:5910–7.
[18] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell 2006;126:677–89.
[19] Klebe RJ. Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. Exp Cell Res 1988;179:362–73.
[20] Klebe RJ, Thomas CA, Grant GM, Grant A, Gosh P. Cytoscription: computer controlled micropositioning of cell adhesion proteins and cells. Methods Cell Sci 1994;16:189–92.
[21] Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. Tissue Eng Part B Rev 2008;14:199–215.
[22] Cui X, Boland T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. Biomaterials 2009;30:6221–7.
[23] Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T. Inkjet printing of viable mammalian cells. Biomaterials 2005;26:93–9.
[24] Wu PK, Ringeisen BR. Development of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human umbilical vein smooth muscle cell (HUVSMC) branch/stem structures on hydrogel layers via biological laser printing (BioLP). Biofabrication 2010;2:014111.
[25] Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. Cell 2007;130:601–10.
[26] Fernandes TG, Diogo MM, Clark DS, Dordick JS, Cabral JMS. High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. Trends Biotechnol 2009;27:342–9.
[27] Bruzewicz DA, McGuigan AP, Whitesides GM. Fabrication of a modular tissue construct in a microfluidic chip. Lab Chip 2008;8:663–71.
[28] Albrecht DR, Underhill GH, Wassermann TB, Sah RL, Bhatia SN. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. Nat Methods 2006;3:369–75.
[29] Anderson DG, Putnam D, Lavik EB, Mahmood TA, Langer R. Biomaterial microarrays: rapid, microscale screening of polymer–cell interaction. Biomaterials 2005;26:4892–7.
[30] Taff BM, Voldman J. A scalable addressable positive-dielectrophoretic cell-sorting array. Anal Chem 2005;77:7976–83.
[31] Lee M, Kumar RA, Sukumaran SM, Hogg MG, Clark DS, Dordick JS. Three-dimensional cellular microarray for high-throughput toxicology assays. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:59–63.
[32] Chen C, Barron J, Ringeisen B. Cell patterning without chemical surface modification: cell-cell interactions between printed bovine aortic endothelial cells (BAEC) on a homogeneous cell-adherent hydrogel. Appl Surf Sci 2006;252:8641–5.
[33] Voldman J. Engineered systems for the physical manipulation of single cells. Curr Opin Biotechnol 2006;17:532–7.
[34] Duncan AC, Weisbuch F, Rouais F, Lazare S, Baquey C. Laser microfabricated model surfaces for controlled cell growth. Biosens Bioelectron 2002;17:413–26.
[35] Liu Tsang V, Chen AA, Cho LM, Jadin KD, Sah RL, DeLong S, et al. Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels. FASEB J 2007;21:790–801.
[36] Claeyssens F, Hasan EA, Gaidukeviciute A, Achilleos DS, Ranella A, Reinhardt C, et al. Three-dimensional biodegradable structures fabricated by two-photon polymerization. Langmuir 2009;25:3219–23.
[37] Lazare S, Tokarev V, Sionkowska A, Wiśniewski M. Surface foaming of collagen, chitosan and other biopolymer films by KrF excimer laser ablation in the photomechanical regime. Appl Phys A: Mater Sci Process 2005;81:465–70.
[38] Hopp B, Smausz T, Kresz N, Barna N, Bor Z, Kolozsvári L, et al. Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. Tissue Eng Part A 2005;11:1817–23.
[39] Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB. Application of laser printing to mammalian cells. 1. Thin Solid Films 2004;453–454:383–7.
[40] Othon CM, Wu X, Anders JJ, Ringeisen BR. Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells. Biomed Mater 2008;3:034101.
[41] Ringeisen BR, Kim H, Barron JA, Krizman DB, Chrisey DB, Jackman S, et al. Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells. Tissue Eng Part A 2004;10:483–91.
[42] Koch L, Kuhn S, Sorg H, Gruene M, Schlie S, Gaebel R, et al. Laser printing of skin cells and human stem cells. Tissue Eng Part C Methods 2009;12. 091221133515000.

AUTHOR QUERY FORM

ELSEVIER	**Journal:** APSUSC **Article Number:** 20925	**Please e-mail or fax your responses and any corrections to:** **E-mail:** corrections.esch@elsevier.thomsondigital.com **Fax:** +353 6170 9272

Dear Author,

Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list.

For correction or revision of any artwork, please consult http://www.elsevier.com/artworkinstructions.

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Click on the 'Q' link to go to the location in the proof.

Location in article	Query / Remark: click on the Q link to go Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	Figs. 1–5 will appear in black and white in print and in color on the web. Based on this, the respective text has been updated. Please check, and correct if necessary.
Q2	Citation [28] has not been found in the reference list. Please supply full details for this reference.

Thank you for your assistance.

Applied Surface Science xx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Research highlights

Applied Surface Science xx (2010) xxx–xxx

Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting

Sylvain Catros*, Bertrand Guillotin, Markéta Bačáková, Jean-Christophe Fricain, Fabien Guillemot

► Laser Assisted Bioprinting parameters have a significant influence on printed cell viability. ► Increasing the laser energy tends to augment the cell mortality. ► Increasing the thickness of the hydrogel film on receiving substrate support cell viability after printing. ► Increasing the viscosity of the cell bioink support cell viability after printing.

Applied Surface Science xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting

Sylvain Catros[a,b,*,1], Bertrand Guillotin[a,1], Markéta Bačáková[a], Jean-Christophe Fricain[a,b], Fabien Guillemot[a]

[a] INSERM, U577, Bordeaux F-33076, France, University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux F-33076, France
[b] Faculty of Dentistry, University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux F-33076, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 June 2010
Received in revised form 4 November 2010
Accepted 8 November 2010
Available online xxx

Keywords:
Laser Assisted Bioprinting
Cell viability
Hydrogels

ABSTRACT

Biofabrication of three dimensional tissues by Laser-Assisted Bioprinting (LAB) implies to develop specific strategies for assembling the extracellular matrix (ECM) and cells. Possible strategies consist in (i) printing cells onto or in the depth of ECM layer and/or (ii) printing bioinks containing both cells and ECM-like printable biomaterial. The aim of this article was to evaluate combinatorial effects of laser pulse energy, ECM thickness and viscosity of the bioink on cell viability. A LAB workstation was used to print Ea.hy926 endothelial cells onto a quartz substrate covered with a film of ECM mimicking Matrigel™. Hence, effect of laser energy, Matrigel™ film thickness and bioink viscosity was addressed for different experimental conditions (8–24 μJ, 20–100 μm and 40–110 mPa s, respectively). Cell viability was assessed by live/dead assay performed 24 h post-printing. Results show that increasing the laser energy tends to augment the cell mortality while increasing the thickness of the Matrigel™ film and the viscosity of the bioink support cell viability. Hence, critical printing parameters influencing high cell viability have been related to the cell landing conditions and more specifically to the intensity of the cell impacts occurring at the air–ECM interface and at the ECM–glass interface.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

From pioneering works performed by Klebe et al. [1,2], technological advances in the fields of automation, miniaturization and computer-aided design and computer aided machining (CAD–CAM) have accompanied the development of bioprinting [3]. The bioprinting technology has been recently defined as "the use of computer-aided transfer processes for patterning and assembling living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization in order to produce bioengineered structures serving in regenerative medicine, pharmacology and basic cell biology studies" [4]. As compared to traditional approaches in tissue engineering [5,6], bioprinting represents a paradigm shift. Indeed, its principle is not more to seed cells onto a biodegradable scaffold [6] but rather to organize the individual elements of the tissue during its fabrication step (before its maturation) through the layer-by-layer deposit of biologically relevant components. Moreover, while giving a better control on the cell distribution into 3D constructs, such an automatized and bottom-up approach should also tend to minimize contamination issues during tissue engineering process and reduce duration for manufacturing a fully functional engineered-tissue.

Besides ink-jet printing [7–9] and pressure-operated mechanical extruder [10–12], Laser Assisted Bioprinting (LAB) has emerged as an alternative method to print cells with a micron-scale precision [13] since it overcomes some of the limitations of ink-jet and extruding printing devices like the clogging of printer heads. Based on laser-induced forward transfer principle, LAB has been developed through several declinations named matrix assisted pulse laser evaporation–direct write [14], absorbing-film assisted-LIFT [15] or biological laser printing [16]. A typical LAB set up comprises a laser beam focused on a ribbon, made of a transparent glass slide coated with a thin liquid layer embedding biological components (bioink), and a receiving substrate placed at a few hundred micrometer distance from the ribbon. Its physical principle is based on the generation, into the depth of the bioink film, of a cavitation-like bubble whose expansion and collapsing [17] induce a jet formation [18]. Experimental set-up for high resolution and high throughput requires to take into account many printing

* Corresponding author at: Université Victor Segalen Bordeaux 2, Zone Nord, Bât 4A, case postale 45, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. Tel.: +33 05 57 57 92 73; fax: +33 05 56 90 05 17.
E-mail address: sylvaincatros@hotmail.com (S. Catros).
[1] These two authors equally contributed to this work.

0169-4332/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.049

Please cite this article in press as: S. Catros, et al., Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting, Appl. Surf. Sci. (2010), doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.049

UNCORRECTED PROOF

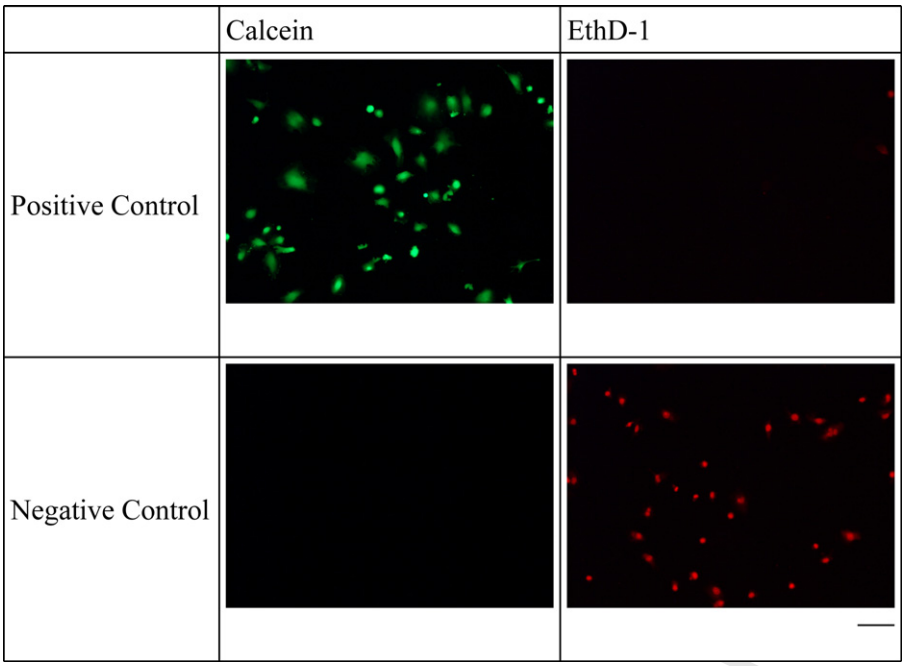


Fig. 1. Positive and negative control of live/dead assay: Ea.hy926 cells cultured on 100 μm Matrigel™ film after 24 h (Bar = 100 μm).

parameters related to laser pulse characteristics (wavelength, pulse duration, repetition rate, energy, beam focus diameter), bioink properties (viscosity, thickness, surface tension) as well as substrate characteristics [19,20].

Since the extracellular matrix (ECM) is crucial for cell homeostasis *in vitro* and *in vivo*, the biofabrication of 3D tissues using bioprinting technology involves to develop strategies for combining printable biomaterials (i.e. artificial ECM) and living cells. Two strategies can be envisaged: (i) printing cells onto/into the thickness of ECM layer substrate prior to stacking layers; (ii) printing bioink droplets containing both cells and ECM as a Lego™ approach. Consequently, the bioink should have specific properties: (i) to stabilize the printed cell pattern as previously shown with a fibrin hydrogel [20], (ii) to help in mechanically supporting the subsequent bioink layer and (iii) to control ECM stiffness with the ability to regulate cell fate [21]. Furthermore, the bioprinting procedure should not be harmful to the cells. In this aim, we have recently proposed to supplement the cell containing bioink with sodium alginate solution, as a preliminary approach to mimic ECM [21,22].

The viability of cells printed by LAB may depend on some critical physical parameters governing droplet ejection (laser energy, viscosity and surface tension of the bioink, and thickness of the film of bioink), as well as on the receiving film thickness (landing mattress) and the air gap length between the ribbon and the receiving substrate [13]. Previous studies on cell printing by laser have demonstrated high cell viability using different cell types [15,16,23], whereas other experimental conditions may trigger cell death [15,24,25].

Consequently, the current work aims at exploring the printing conditions to assembly printable biomaterials (i.e. artificial ECM) and cells according to above-mentioned strategies. More specifically, this article aims at evaluating combinatorial effects of laser pulse energy, ECM thickness and bioink viscosity on cell viability. In this purpose, a LAB workstation was used to print, using increasing laser pulse energies (8–24 μJ) Ea.hy926 endothelial cells embedded in sodium alginate solutions associated with a controlled viscosity (40–110 mPa s) onto a quartz substrate covered with films of ECM mimicking Matrigel™ (20–100 μm).

2. Experimental

2.1. Laser Assisted Bioprinter and Printing conditions

The LAB workstation has been described elsewhere [19]. Briefly, it comprises a Nd:YAG infra-red laser (Spectra Physics, λ = 1064 nm, 30 ns) driven with galvanometric mirrors (scanning system) and focused onto the ribbon. The LAB workstation is equipped with a dedicated software, allowing to adjust each printing parameter individually such as laser pulse rate and energy, scanning speed and blue print features [19].

All the experiments were performed using a 5 kHz laser pulse rate, a 15 mm diaphragm aperture, 200 mm/s scanning speed and a 500 μm space between the ribbon and the substrate. Ribbons were made of a quartz slide coated with a laser-absorbing interlayer of gold (50 nm) using a sputter coater (EMSCOPE SC500) onto which a 20 μm-thick film of bioink was manually spread out. Laser energy used was adjusted from 8 to 24 μJ which are the lowest workable energy to produce droplet ejection and the highest energy allowed in our experimental conditions, respectively. Cell printing patterns corresponded to three parallel lines of 10 mm in length with a pitch of 200 μm. For experiments in which different laser energies were compared, cells were printed with different laser energies onto the same ribbon to allow direct comparison.

2.2. Cell culture

Ea.hy926 cells were cultured in plastic dishes in Iscove modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), in controlled atmosphere (100% humidity, 37 °C, 5% CO_2).

2.3. Cell containing bioink preparation

Cells were detached from the plastic dish with a solution of 0.125% (w/v) trypsin and 2 mM EDTA. Cells were suspended in an appropriate volume of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) at a cell concentration of 50 million cells/ml. The cell suspension

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: S. Catros, et al., Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting, Appl. Surf. Sci. (2010), doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.049

was supplemented with (0.5% or 1% (w/v) sodium alginate solution (Protanal 10/60 – FMC BioPolymer).

2.4. Substrate preparation

Sterilized receiving quartz substrates were coated with Matrigel™ (BD Bioscience) under sterile conditions. An appropriate volume of 4 mg/ml Matrigel™ was spread at 4 °C onto the quartz substrate to obtain the desired film thickness: 20 μm, 40 μm, 60 μm, 80 μm or 100 μm. Matrigel™ was allowed to solidify for 5 min in controlled atmosphere (100% humidity, 37 °C, 5% CO_2) prior to perform printing experiment.

2.5. Live/dead assay

Printed cells were stained 24 h after the experiment using live/dead assay kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The samples were incubated in IMDM supplemented with 10% FBS and 2 μM calcein-AM and 4 μM ethidium homodimer (EthD-1) for 20 min in controlled atmosphere (100% humidity, 37 °C, 5% CO_2). Positive control was obtained after culturing Ea.hy926 cells on Matrigel™ during 24 h. Negative control was produced by fixing cells with 70% ethanol.

2.6. Image analysis

The receiving substrates were observed 24 h after each experiment with microscope Nikon Eclipse 80i equipped with digital camera Dxm1200C and the following filter set: calcein: Ex 465–495 nm/DM: 505 nm/EM: 515–555 nm; and EthD-1: Ex 540–580 nm/DM: 595 nm/EM: 600–660 nm. Images were analyzed with software NIS-Elements AR 3.0.

3. Results

3.1. Positive and negative control for cell viability

In positive control condition, living cells cultured on plastic dishes were stained in fluorescent green by calcein (Fig. 1). In negative control condition, dead cells were stained in fluorescent red by EthD-1. Dead cells were barely present in the positive control.

3.2. Effect of laser pulse energy on cell viability

To address the effect of laser pulse energy on cell viability, Ea.hy926 cells were printed onto a 100 μm thick film of Matrigel™ using various laser pulse energies (Fig. 2). With a laser energy of 8 μJ, the cell viability was comparable to the positive control (Fig. 1). With a laser energy of 24 μJ, more dead cells were present. However, bigger droplets containing more cells were generated using 24 μJ instead of 8 μJ, resulting in printing more cells using 24 μJ. In conclusion, we did not observe a dramatic alteration of cell viability between 8 μJ and 24 μJ laser energy on 100 μm thick Matrigel™ film (Fig. 2).

3.3. Combined effect of laser energy and substrate thickness on cell viability

To address the combined effect of laser energy and substrate thickness on cell viability, Ea.hy926 were printed using increasing laser pulse energies from 8 μJ to 24 μJ onto Matrigel™ film of increasing thickness from 20 μm to 100 μm (Fig. 3).Using a laser energy of 8 μJ, the presence of dead cells was higher on 20 μm (50% cell mortality) Matrigel™ film than on 40–100 μm thick

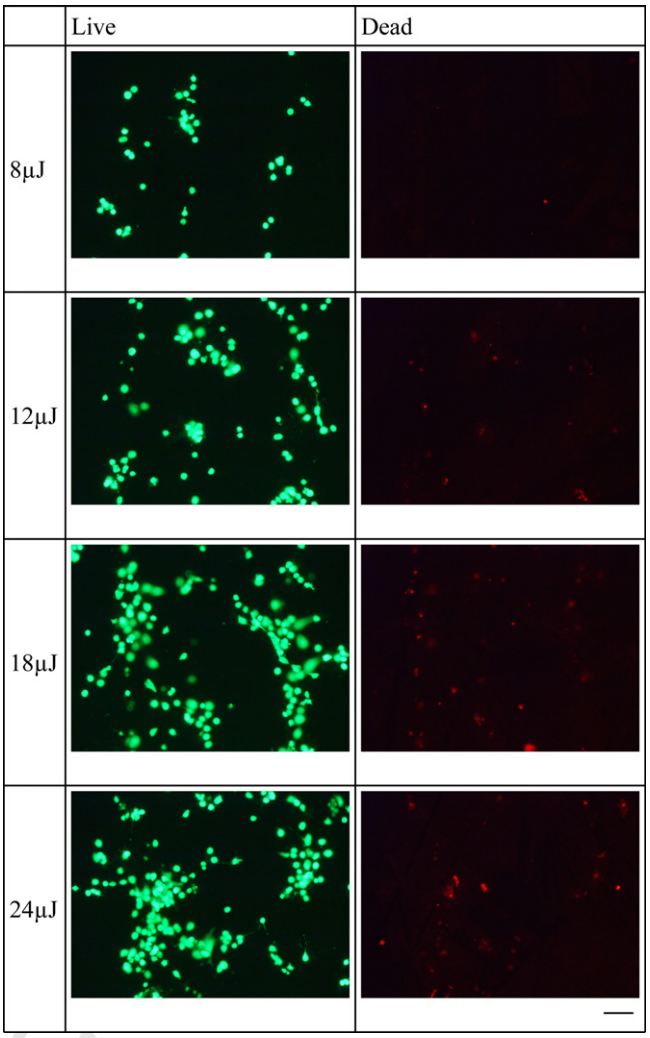


Fig. 2. Effect of laser energy on cell viability: Ea.hy926 cells printed onto a glass substrate coated with 100 μm Matrigel™ film (Bar = 100 μm).

Matrigel™ film (30–10% cell mortality). However, we observed the presence of faint green stained cells with a shrunk morphology among bright green stained cells on 20 μm Matrigel™ film compared to 40, 60, 80 and 100 μm. Such a different cell fate was more clearly observed when cells were printed using a laser pulse energy of 24 μJ. Indeed, on 20 μm thick Matrigel™ film, 100% of the cells then adopted a shrunk morphology with a faint green staining. These cells did not spread on the substrate over time and did not proliferate (not shown), thus they were considered dead. With 40 and 60 μm thick Matrigel™ films, we observed a mix of faint green and bright green cells (60% and 40% cell mortality respectively), whereas faint green cells were not observed on 80 and 100 μm thick Matrigel™ film (30% and 37% cell mortality respectively). Interestingly, not all the dead cells in Figs. 2 and 3 stained bright red like the negative control shown in Fig. 1. (For interpretation of the references to color in this text, the reader is referred to the web version of this article).

Moreover, observation of cells printed in 100 μm thick Matrigel™ film revealed that at least two different focus planes could be considered (Fig. 4). Some of the printed cells reached the glass surface and spread on it (Fig. 4A), whereas other cells remained trapped and round-shaped inside the Matrigel™ film (Fig. 4B).

UNCORRECTED

Please cite this article in press as: S. Catros, et al., Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting, Appl. Surf. Sci. (2010), doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.049

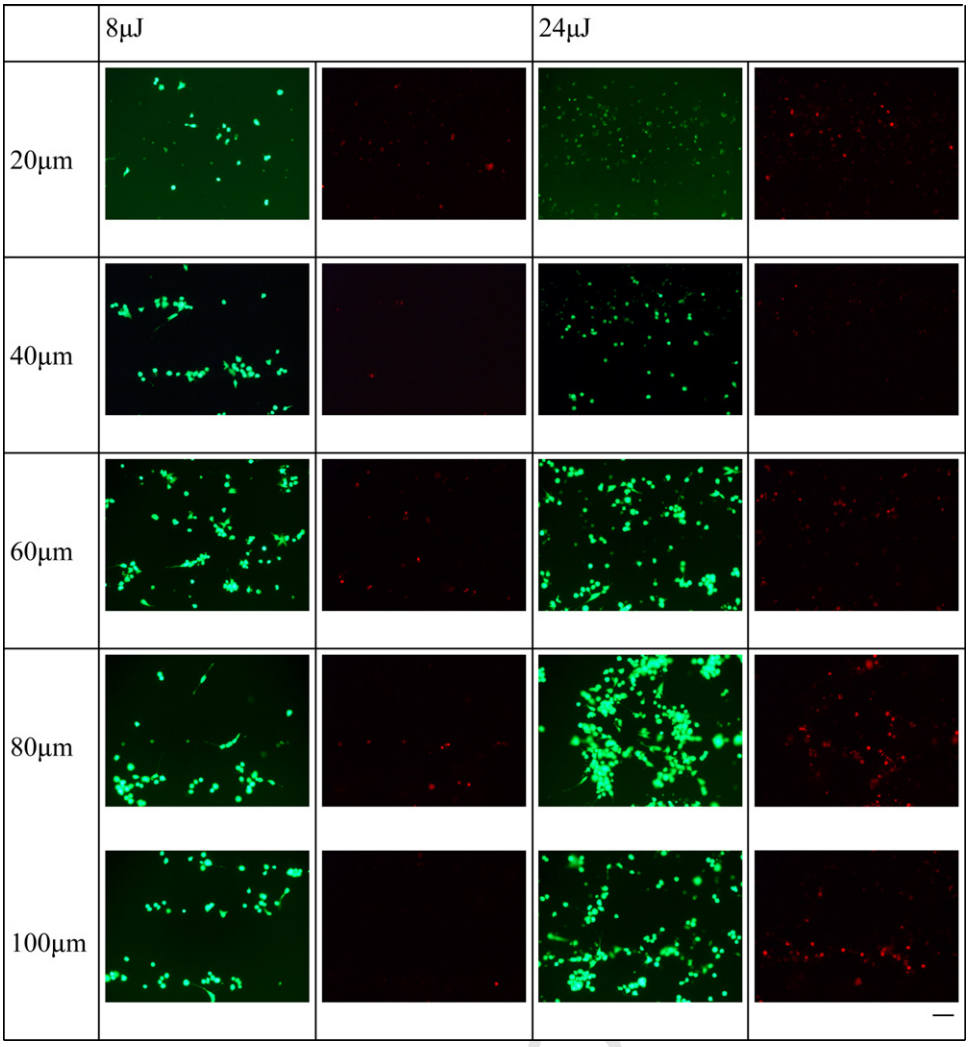


Fig. 3. Effect of laser energy and Matrigel™ film thickness on cell viability (Bar = 100 µm).

3.4. *Influence of bioink viscosity on cell viability*

Finally, the effect of bioink viscosity on Ea.hy926 cell viability was studied using different concentrations of sodium alginate. Concentrations of 0.5% or 1% (w/v) were used, corresponding to a viscosity of 40 and 110 mPa s, respectively. The cells were then printed using different laser pulse energies of 12 µJ, 18 µJ or 24 µJ onto a 40 µm thick film of Matrigel™ (Fig. 5). The thickness of 40 µm was retained since it was described as a threshold regarding cell viability after laser printing (Fig. 3). Results show that the green calcein staining was higher for Ea.hy926 cells printed using a 1% (w/v) alginate concentration than for the 0.5% (w/v) alginate

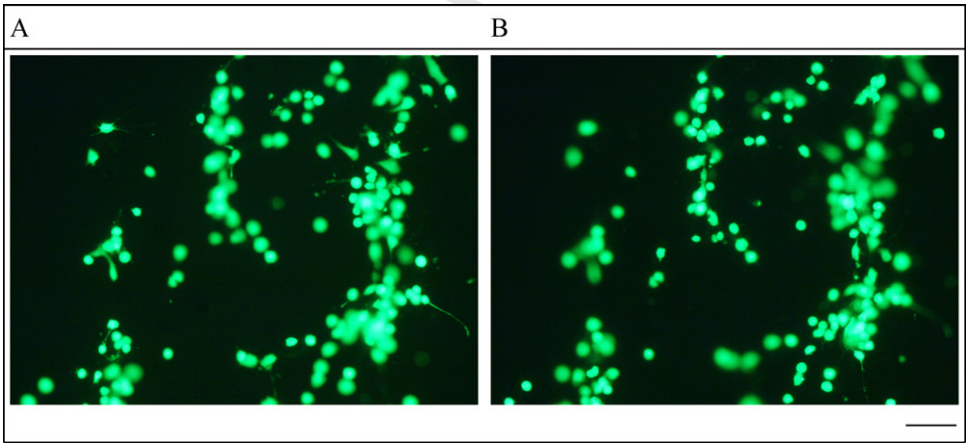


Fig. 4. Penetration of the printed cells into the thickness of the Matrigel™ film. (A) Cells spread on glass substrate; (B) round cells inside Matrigel™ film thickness (Bar = 100 µm).

Please cite this article in press as: S. Catros, et al., Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting, Appl. Surf. Sci. (2010), doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.049

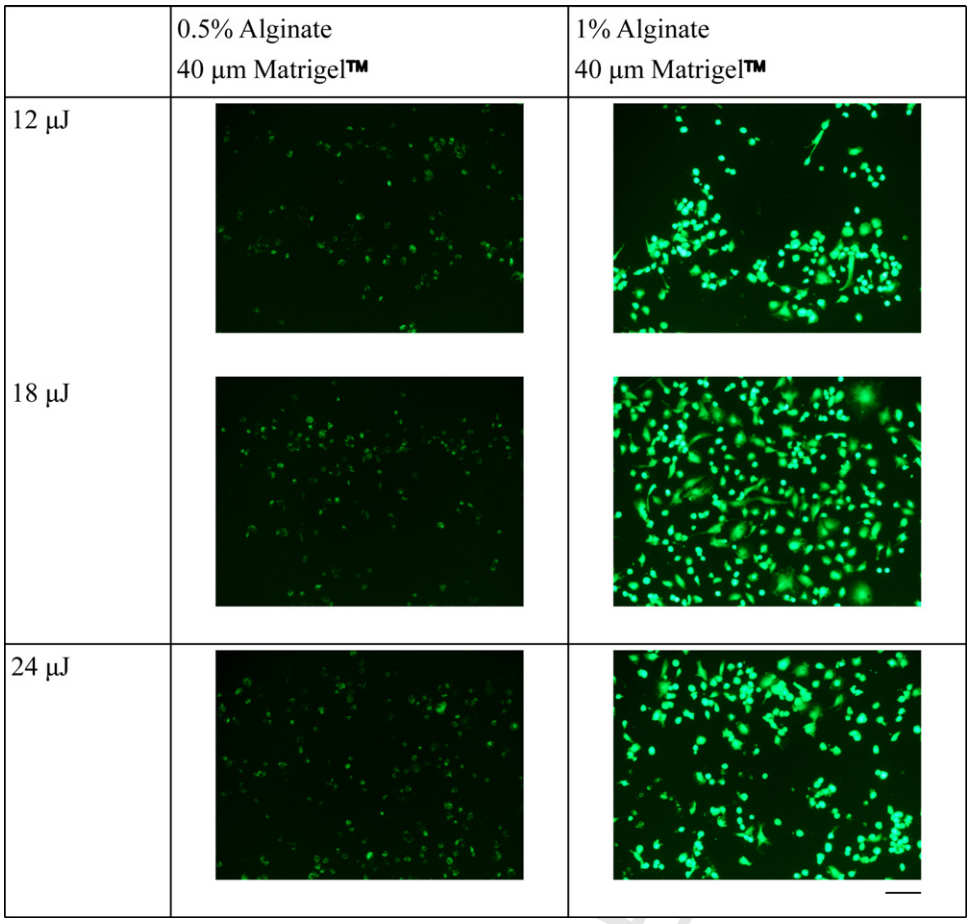


Fig. 5. Influence of bioink viscosity on cell viability (Bar = 100 μm).

concentration, whatever the laser pulse energy being used. These results demonstrate that increasing the bioink viscosity improves cell viability after LAB.

4. Discussion

This work shows that the viability of human endothelial cell line Ea.hy926 printed by LAB depends on the combination of many parameters including laser energy, ECM film thickness onto the receiving substrate and bioink viscosity. Thus, increasing the laser energy has a negative impact on the viability of Ea.hy926 cells whereas increasing the Matrigel™ film thickness or/and the viscosity of the bioink improves the cell viability.

Generally, cell integrity and cell fate might be altered by mechanical, thermal, chemical or/and biochemical constraints. More specifically, regarding the LAB process, cell damages can be associated with: (i) the bioink biocompatibility, (ii) interactions of cell components with light, (iii) thermal stress occurring during droplet ejection, and finally (iv) mechanical stress.

Regarding bioink biocompatibility, the absence of toxicity, which has been confirmed in Fig. 1, can be related to the absence of glycerol as well as to the fact that a widely used biomaterial (alginate) was retained as the thickening agent [22].

Regarding cell–light interactions, laser wavelength should not induce alteration of the biological materials used. Consequently, due to the potential denaturation of DNA by UV irradiation, a near infra-red laser (1064 nm) was preferred to UV lasers in the bioprinter set-up.

Regarding potential thermal stress, results presented in this article confirm that cell viability is independent of laser-induced thermal stress, within the conditions studied. Indeed, high cell viability can be obtained with different laser irradiation conditions, corresponding to as many thermal flux intensities. This has to be related to numerical models giving that (i) the liquid water thickness heated during the laser pulse is only a few micrometers, and (ii) the whole cell droplet formation occurs within a few microseconds [17].

Regarding mechanical stress during laser-assisted cell printing, cell damages have potential origins which may be chronologically related to: (i) the hydrodynamic pressure during bubble growth (it was estimated to be a few MPas at a certain distance from bubble front [26], (ii) the shear stress during jetting (which depends on jet velocity), and (iii) landing conditions, which are related to the initial jet velocity and the mattress thickness.

In the conditions studied, the mechanical stress happening during jet formation, i.e. when cells may undergo an initial compression wave followed by an increase of the hydrodynamic pressure (specially in the bubble apex where a singular point is formed [17]), seems to have no significant effect on cell viability. Similar to the discussion on the potential thermally induced damages, a high cell viability can be obtained with different laser irradiation conditions, corresponding to as many pressure levels.

Regarding shear stress within the jet, by assuming a jet velocity, a jet diameter, a bioink density and a viscosity equal to 50 m/s, 10 μm, 1.03 kg/l and 100 mPa s, respectively, Reynold's number Re is found close to 10. Even by reducing the viscosity and increasing jet velocity, Re remains in the laminar flow regime (Re = 200), which is generally assumed to be less traumatizing than turbulent flow for endothelial cells, especially as a very transient phenomena (100 μs).

Please cite this article in press as: S. Catros, et al., Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting, Appl. Surf. Sci. (2010), doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.049

Regarding landing conditions, results show that laser pulse energy, Matrigel™ film thickness and bioink viscosity interplay for controlling of Ea.hy926 cell viability. High cell viability was thus observed by combining a low laser energy (8 μJ) with a high Matrigel™ film thickness (at least 40 μm). In the opposite, cells printed with a higher laser energy (24 μJ) onto a Matrigel™ film thinner than 40 μm appeared damaged or dead. Such results are in good agreement with Ringeisen et al. [25] who have shown that cell viability reaches 95% when the substrate is coated by a 40 μm thick Matrigel™ film, and with the study of Lin et al. [24] who demonstrated that human colon cancer cells viability decreases as the laser fluence increases. As proposed by Wang et al. using numerical modeling [27], such events may be related to the two successive cell impacts occurring during cell landing onto the receiving substrate: 1) a first impact occurring at the air–hydrogel interface and 2) a more traumatic impact at the hydrogel–glass interface. In the above-mentioned studies [25,27], whereas the first impact always occurs during the printing process, the second impact occurred only for a mattress thinner than 40 μm [28]. In the current study, results demonstrate that high cell viability can be maintained for thinner Matrigel™ film (e.g. for 20 μm thick Matrigel™ film) when laser energy is reduced (e.g. 8 μJ), and/or by using a viscous bioink. Indeed, increasing the bioink viscosity, by increasing the sodium alginate content from 0.5% to 1% (w/v), improved the viability of Ea.hy926 endothelial cells. Since an increase of the bioink viscosity reduces jet velocity, it tends to minimize impacts intensity, thus improving cell viability after printing. More precisely, reducing jet velocity tends to vanish the secondary impact onto the glass substrate, as featured in Fig. 4B where most cells remained trapped inside the Matrigel™ film.

5. Conclusions

This study has shown that the laser energy, the Matrigel™ film thickness and the bioink viscosity have a combinatorial influence on the viability of Ea.hy926 cells printed by Laser-Assisted Bioprinting. Increasing the laser energy tends to augment the cell mortality while increasing the thickness of the Matrigel™ film and the viscosity of the bioink support cell viability. Hence, critical printing parameters influencing high cell viability have been related to the cell landing conditions and more specifically to the intensity of the cell impacts occurring at the air–hydrogel interface and at the hydrogel–glass interface.

Further studies in cell biology are needed to understand which cell components are altered during laser printing. Experiments combining time-resolved imaging and confocal microscopy should be also performed to confirm that cell viability is related to jet velocity and cell penetration into the receiving hydrogel film.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Région Aquitaine, GIS Advanced Materials in Aquitaine and the French Institute for Dental Research (IFRO) for financial support. Markéta Bačáková acknowledges a mobility grant from the EU ERASMUS program.

References

[1] R.J. Klebe, Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues, Exp. Cell Res. 179 (1988) 362–373.
[2] R.J. Klebe, C.A. Thomas, G.M. Grant, A. Grant, P. Gosh, Cytoscription: computer controlled micropositioning of cell adhesion proteins and cells, Methods Cell Sci. 16 (1994) 189–192.
[3] V. Mironov, N. Reis, B. Derby, Bioprinting: a beginning, Tissue Eng. 12 (2006) 631–634.
[4] F. Guillemot, V. Mironov, M. Nakamura, Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09), Biofabrication 2 (2010) 010201.
[5] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering, Science 260 (1993) 920–926.
[6] D.W. Hutmacher, J.T. Schantz, C.X.F. Lam, K.C. Tan, T.C. Lim, State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective, J. Tissue Eng. Regen. Med. 1 (2007) 245–260.
[7] E. Roth, T. Xu, M. Das, C. Gregory, J. Hickman, T. Boland, Inkjet printing for high-throughput cell patterning, Biomaterials 25 (2004) 3707–3715.
[8] M. Nakamura, A. Kobayashi, F. Takagi, A. Watanabe, Y. Hiruma, K. Ohuchi, Y. Iwasaki, M. Horie, I. Morita, S. Takatani, Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells, Tissue Eng. 11 (2005) 1658–1666.
[9] R.E. Saunders, J.E. Gough, B. Derby, Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing, Biomaterials 29 (2008) 193–203.
[10] K. Nair, M. Gandhi, S. Khalil, K.C. Yan, M. Marcolongo, K. Barbee, W. Sun, Characterization of cell viability during bioprinting processes, J. Biotechnol. 4 (2009) 1168–1177.
[11] G. Vozzi, C. Flaim, A. Ahluwalia, S. Bhatia, Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition, Biomaterials 24 (2003) 2533–2540.
[12] C. Norotte, F.S. Marga, L.E. Niklason, G. Forgacs, Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting, Biomaterials 30 (2009) 5910–5917.
[13] F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering, Nanomedicine 5 (2010) 507–515.
[14] J.A Barron, B.R. Ringeisen, H. Kim, B.J. Spargo, D.B. Chrisey, Application of laser printing to mammalian cells, Thin Solid Films 453 (2004) 383–387.
[15] B. Hopp, T. Smausz, N. Kresz, N. Barna, Z. Bor, L. Kolozsvari, D.B. Chrisey, A. Szabo, A. Nogradi, Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer, Tissue Eng. 11 (2005) 1817–1823.
[16] J. Barron, P. Wu, H. Ladouceur, B. Ringeisen, Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns, Biomed. Microdevices 6 (2004) 139–147.
[17] C. Mezel, L. Hallo, A. Souquet, J. Breil, D. Hebert, F. Guillemot, Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime, Phys. Plasmas 16 (2009) 123112–123212.
[18] M. Duocastella, J. Fernandez-Paras, P. Serra, J. Morenza, Jet formation in the laser forward transfer of liquids, Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process. 93 (2008) 453–456.
[19] F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J.C. Fricain, J. Amédée, High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering, Acta Biomater. 6 (2010) 2494–2500.
[20] B. Guillotin, A. Souquet, S. Catros, M. Duocastella, B. Pippenger, S. Bellance, R. Bareille, M. Rémy, L. Bordenave, J. Amédée, F. Guillemot, Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization, Biomaterials 31 (2010) 7250–7256.
[21] N. Huebsch, P.R. Arany, A.S. Mao, D. Shvartsman, O.A. Ali, S.A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano, D.J. Mooney, Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate, Nat. Mater. 9 (2010) 518–526.
[22] J.A. Rowley, G. Madlambayan, D.J. Mooney, Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials, Biomaterials 20 (1999) 45–53.
[23] L. Koch, S. Kuhn, H. Sorg, M. Gruene, S. Schlie, R. Gaebel, B. Polchow, K. Reimers, S. Stoelting, N. Ma, P.M. Vogt, G. Steinhoff, B. Chichkov, Laser printing of skin cells and human stem cells, Tissue Eng. Part C: Methods 16 (2010) 847–854.
[24] Y. Lin, G. Huang, Y. Huang, T.J. Tzeng, D. Chrisey, Effect of laser fluence in laser assisted direct writing of human colon cancer cell, Rapid Prototyping J. 16 (2010) 202–208.
[25] B.R. Ringeisen, K. Heungsoo, J.A. Barron, D.B. Krizman, D.B. Chrisey, S. Jackman, R.Y.C. Auyeung, B.J. Spargo, Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells, Tissue Eng. 10 (2004) 483–491.
[26] W. Wang, G. Li, Y. Huang, Modeling of bubble expansion-induced cell mechanical profile in laser-assisted cell direct writing, J. Manuf. Sci. Eng. 131 (2009) 051013–051110.
[27] W. Wang, Y. Huang, M. Grujicic, D.B. Chrisey, Study of impact-induced mechanical effects in cell direct writing using smooth particle hydrodynamic method, J. Manuf. Sci. Eng. 130 (2008) 021012–21110.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: S. Catros, et al., Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting, Appl. Surf. Sci. (2010), doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.049

Med Buccale Chir Buccale 2010;16:227-237
© SFMBCB 2010
DOI: 10.1051/mbcb/2010031

www.mbcb-journal.org

M B Médecine Buccale Chirurgie Buccale C B

Mise au point

Ingénierie tissulaire osseuse en chirurgie buccale et maxillo-faciale : applications cliniques

Sylvain Catros[1,2,3*], Fabien Guillemot[1], Joëlle Amédée[1], Jean-Christophe Fricain[1,2,3]

[1] Inserm U577 Biomatériaux et Réparation tissulaire, 16 rue Léo Saignat, Case 45, 33076 Bordeaux Cedex, France
[2] Faculté de Chirurgie dentaire, 16-20 cours de la Marne, 33076 Bordeaux, France
[3] Pôle d'Odontologie et de Santé buccale, Hôpital Pellegrin, 33000 Bordeaux, France

(Reçu le 22 août 2010, accepté le 7 septembre 2010)

Mots clés :
ingénierie tissulaire osseuse / scaffold / BMP / cellules souches mésenchymateuses / reconstruction osseuse

Résumé – L'ingénierie tissulaire osseuse a pour objectif général de repousser les limites des méthodes conventionnelles de régénération osseuse en utilisant les progrès des connaissances dans le domaine de la biologie, de l'ingénierie, de la physique ou encore de la robotique. Quatre éléments sont associés dans cette démarche d'ingénierie : un matériau support pour la croissance tissulaire (scaffold), des cellules autologues, des facteurs de croissance et une période de maturation *in vitro* ou *in vivo*. Dans la sphère buccale et maxillo-faciale, il s'agit de répondre au problème de la vascularisation des greffons de grande taille sur un terrain fragilisé et de remplacer les autogreffes osseuses qui peuvent provoquer une morbidité importante du site donneur.
L'objectif de cet article est une mise au point sur les applications cliniques humaines de l'ingénierie tissulaire osseuse pour la cavité buccale et la face. La méthode utilisée comporte une recherche bibliographique sur Pubmed et Medline avec des mots clés spécifiques. De plus, des critères d'inclusion et d'exclusion des articles recueillis ont été définis. Quarante-huit publications internationales ont été retenues et classées en fonction de leur domaine d'application. Il s'agissait de reconstruction mandibulaire (19 articles), de reconstruction osseuse dans le traitement des fentes faciales (6 articles) ou de régénération osseuse pré-implantaire (23 articles). L'analyse de ces publications a montré qu'il s'agissait essentiellement d'études de faible puissance, à l'exception de 6 études prospectives randomisées dans le domaine de la régénération osseuse pré-implantaire. L'association d'un scaffold à des facteurs de croissance (BMPs) semble constituer la combinaison qui donne les meilleurs résultats. Pour la reconstruction mandibulaire, la méthode de pré-vascularisation *in vivo* des produits d'ingénierie tissulaire est une technique complexe mais prometteuse pour les patients en échec thérapeutique. L'ingénierie tissulaire osseuse a montré son efficacité dans la chirurgie pré-implantaire. Elle permettra peut-être bientôt d'envisager des techniques moins invasives.

Key words:
bone tissue engineering / scaffold / BMP / mesenchymal stem cells / bone reconstruction

Abstract – Bone tissue engineering in oral and maxillofacial surgery: clinical applications. Bone tissue engineering was developed to solve current limitations of conventional bone regeneration through an adequate combination of biology, engineer science, physics or robotics. There are 4 individual components necessary to define tissue engineering: the scaffold, the autologous cells, the growth factors and the maturation step (*in vitro* or *in vivo*). The objectives of oral and maxillofacial applications of bone tissue engineering are to improve vascularization of large osseous grafts and to avoid the morbidity of autografts harvest site. The aim of this article is to bring an update on human clinical applications of oral and maxillofacial bone tissue engineering. We did a bibliographic research in Pubmed and Medline databases with specific keywords. Inclusion and exclusion criteria were also defined. We finally retained 48 international articles, which covered 3 different fields. The subjects were mandibular reconstruction (19 articles), facial cleft treatment (6 articles) and bone regeneration related to dental implants (23 articles). Most of these articles were case reports and only 6 studies were prospective studies in the field of bone regeneration related to dental implants. Today, the best clinical results are obtained using a scaffold loaded with growth factors (BMPs). For mandibular reconstruction, *in vivo* maturation of tissue engineering products is a promising technique in selected patients. Bone tissue engineering is already an efficient technique in pre-implant bone surgery and could led to a lower morbidity of reconstructive procedures.

* Correspondance : sylvaincatros@hotmail.com

Abréviations

BMP	: bone morphogenetic protein
GDF-5	: growth and differenciation factor -5
HA	: hydroxyapatite
HA-TCP	: hydroxyapatite-phosphate tricalcique
IT	: ingénierie tissulaire
PIT	: produit d'ingénierie tissulaire
PLGA	: poly (lactic-co-glycolicacid)
PRF	: platelet rich fibrin
PRP	: platelet rich plasma
rhBMP-2	: human recombinant bone morphogenetic protein -2
rhBMP-7	: human recombinant bone morphogenetic protein -7
rhGDF-5	: recombinant growh and differenciation factor -5
TCP	: phosphate tricalcique
TGF	: transforming growth factor

L'ingénierie tissulaire (IT) a été définie comme « l'ensemble des techniques et des méthodes s'inspirant des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie, utilisées pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus » [1]. Le principe général est d'associer une matrice tridimensionnelle (scaffold), avec des cellules autologues et des facteurs de croissance pour reconstruire un nouveau tissu hybride (Fig. 1).

Les applications cliniques chez l'homme existent déjà pour la peau depuis les années 1990 [2]. Plus récemment, des tissus produits par IT ont été développés pour les muscles squelettiques, le cœur, les gros vaisseaux ou le tissu nerveux [3]. Un des objectifs de la médecine régénératrice est de développer des substituts d'organes entiers (vessie, rein, pancréas) pour faire face aux demandes croissantes de greffons.

L'IT osseuse a été développée pour repousser les limites des méthodes conventionnelles de traitement des pertes de substance osseuses, en particulier la morbidité induite par les autogreffes et l'absence d'intégration des greffes de grande taille.

L'objectif de cette mise au point est de rechercher quelles sont les applications cliniques humaines actuelles et quel est le bénéfice de l'ingénierie tissulaire osseuse dans la sphère buccale et maxillo-faciale.

Matériel et méthodes

Méthode de recherche

Les bases de données Medline et Pubmed ont été consultées sur la période 1999-2010 pour les articles en anglais ou en français, avec les mots clés suivants :

– mots clés MESH *(Medical Subject Headings)* : « tissue engineering/methods » or « tissue engineering/utilization » or « tissue engineering/veterinary » and « facial bones/surgery » or « facial bones/transplantation » ;

– autres mots clés utilisés : « mandible reconstruction human » / « mandible reconstruction growth factor human » / « mandible reconstruction cells human » / « sinus lift tissue engineering » / « sinus lift growth factor »/ BMP / « maxillary bone tissue engineering » / « sinus lift cells ».

Enfin une recherche manuelle sur les références des articles sélectionnés a été réalisée pour croiser les informations obtenues. Les articles sélectionnés ont ensuite été regroupés en fonction du domaine clinique d'application.

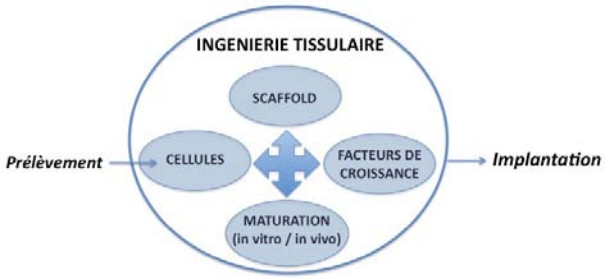


Fig. 1. Les étapes nécessaires à la construction d'un tissu par ingénierie tissulaire.
Fig. 1. Tissue engineering steps for tissue repair.

Critères d'inclusion

Les études cliniques originales ou les cas rapportés utilisant un produit d'ingénierie tissulaire (PIT) osseuse avec au moins deux des quatre critères suivants :

– matrice organique ou inorganique ;
– cellules autologues prélevées, amplifiées et induites ;
– facteurs de croissance ;
– maturation des PIT osseuse (*in vivo* ou *in vitro*).

Critères d'exclusion

– Revues de littérature.

– Études n'utilisant pas au moins deux des critères décrits précédemment.

– Études utilisant le PRP *(Platelet Rich Plasma)* ou le PRF *(Platelet Rich Fibrin)* comme facteur de croissance.

– Études utilisant les autogreffes ou les lambeaux seuls.

Résultats

Quarante-huit articles concernant la reconstruction osseuse dans la sphère maxillo-faciale ont été retenus et analysés en fonction des critères définis. Trente-cinq études correspondent à des rapports de cas, 7 articles à des études prospectives non contrôlées et 6 articles à des études prospectives randomisées de faible puissance.

Seule l'étude de cas de Mesimäki et al. [4] associait les quatre critères d'inclusion. Dans 16 articles, trois des critères d'inclusion étaient présents (scaffold + cellules + maturation

ou scaffold + BMP + maturation). Dans 31 articles, deux critères d'inclusion étaient présents (scaffold et cellules autologues différenciées ou scaffold et facteurs de croissance) (Tabs. I, II et III).

Le scaffold était utilisé dans tous les cas. Les matériaux étaient des phosphates de calcium synthétiques (12 cas), des polymères tressés (9 cas), des allogreffes (5 cas), des xénogreffes d'origine bovine (5 cas), des autogreffes (2 cas), du collagène d'origine bovine (13 cas) ou un gel de fibrine autologue ou non (12 cas). Dans certains cas, plusieurs scaffolds étaient utilisés. Les cellules utilisées étaient le plus souvent issues de moelle osseuse iliaque (15 cas). Elles pouvaient aussi provenir du périoste (7 cas), du tissu adipeux (2 cas) ou bien de la pulpe dentaire (1 cas). Les facteurs de croissance utilisés étaient des BMPs d'origine humaine ou bovine dans les premières études (3 cas). Puis, des formes recombinantes ont été utilisées (rhBMP-2 : 10 cas ; rhBMP-7 : 5 cas, rhGDF : 1 cas).

Dix-neuf articles décrivaient la reconstruction de grands défauts osseux maxillaires ou mandibulaires par ingénierie tissulaire (Tab. I). Il s'agissait toujours de cas complexes, chez des patients en échec thérapeutique avec les méthodes conventionnelles de greffes osseuses ou de lambeaux autologues. Le site receveur était souvent constitué d'un os hypovascularisé et hypocellularisé par la radiothérapie, ou infecté (ostéomyélites) (Tab. I) [4–21].

Les scaffolds utilisés étaient des phosphates de calcium, des cages en titane, des éponges de collagène, de la fibrine ou des polymères (dacron, polycaprolactone). Dans 5 cas, des cellules mésenchymateuses indifférenciées étaient induites vers un phénotype ostéoblastique *in vitro* avant implantation et, dans 5 cas, des greffes osseuses ou de la moelle osseuse autologue ont été utilisées. Les BMPs ont été utilisées dans 12 cas sur 18.

La maturation du PIT a été réalisée *in vivo* dans 7 cas chez l'homme depuis le premier cas publié en 1999 [5]. Quatre cas ont été réalisés à la mandibule [5–8] et un cas au maxillaire [4]. Le principe était de placer l'assemblage construit par IT à proximité d'un muscle, qui est un site favorable pour le développement de la vascularisation (muscle grand dorsal [5, 6, 8, 13], grand pectoral [7] ou grand droit de l'abdomen [4]). Cette étape a permis le dépôt de tissu osseux et la formation de néo-vaisseaux dans les matériaux implantés. Après plusieurs mois de maturation, le greffon était déplacé vers le site receveur grâce à un lambeau pédiculé (1 cas) ou libre (4 cas). Dans un cas, le greffon a subi une maturation *in vitro* avant son implantation (après ensemencement des cellules sur le scaffold) [14].

Deux articles [9, 22] ont présenté des cas de reconstruction mandibulaire par la technique des membranes induites, initialement décrite pour la reconstruction des os longs [23, 24]. Cette méthode a été utilisée à la mandibule pour traiter des cas d'ostéomyélites et d'ostéoradionécroses [9, 19]. Le principe était d'induire dans un premier temps chirurgical la formation d'une membrane synoviale autour du défaut osseux grâce à l'interposition d'une entretoise de ciment polyméthylmétacrylate, puis de combler la perte de substance par une autogreffe ou un biomatériau dans un second temps.

Six rapports de cas (Tab. II) [25–30] présentaient la reconstruction de fentes congénitales palatines ou faciales par ingénierie tissulaire. Les auteurs ont souvent utilisé l'IT en complément de distractions osseuses [25, 26, 30]. Les scaffolds utilisés dans les fentes étaient soit des éponges de collagène, soit de la fibrine (préparée avec du PRP), soit un phosphate de calcium. Des ostéoblastes issus de la moelle osseuse ont été ajoutés aux scaffolds dans 3 cas. Les BMPs ont été utilisées dans un seul cas. La maturation du PIT n'a jamais été utilisée. La reconstruction osseuse obtenue après traitement était quasi complète ou complète, ce qui a permis l'éruption normale des dents retenues dans plusieurs cas.

Dans 23 articles, l'ingénierie tissulaire osseuse a été utilisée pour la régénération osseuse pré-implantaire et parodontale (Tab. III) [31–53]. Il s'agissait de l'élévation du plancher des sinus maxillaires (15 articles), de la régénération de défauts péri-implantaires (3 articles), de l'augmentation osseuse alvéolaire verticale ou transversale (4 articles) ou du traitement de défauts osseux angulaires parodontaux (1 article). Dans ces indications, les scaffolds utilisés étaient soit des matériaux non déformables (phosphates de calcium, xénogreffes : 9 cas), soit des hydrogels (fibrine : 6 cas), soit des éponges (collagène, PLGA ou copolymère acide polyglycolique + acide polylactique : 11 cas). Dans 17 cas sur 23, des cellules mésenchymateuses induites vers un phénotype ostéoblastique (moelle osseuse, tissu adipeux, pulpe dentaire) ont été ensemencées dans les scaffolds. Les BMPs (rhBMP-2) ont été utilisées dans 5 cas pour imprégner des scaffolds et dans un cas, le GDF-5 a été greffé de façon covalente sur un phosphate de calcium. La maturation *in vitro* a été utilisée dans 10 cas. Dans 3 articles [31–53], un protocole commercial d'ingénierie tissulaire osseuse a été mis en œuvre (protocole Bioseed® et protocole Biotissue®). Il s'agissait d'un scaffold de fibres de PLGA ensemencé avec des ostéoblastes issus du périoste, et mis en maturation *in vitro* pendant 7 jours avant implantation. Les résultats étaient inconstants mais globalement positifs avec cette méthode.

Discussion

La méthode de recherche bibliographique a suivi les recommandations du *Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations* de l'HAS [54]. Un grand nombre d'articles avec un faible niveau de preuve a été retenu car il existait peu d'études humaines. En effet, de nombreuses études existaient sur des modèles animaux mais peu d'études ont été publiées chez l'homme. Cela peut s'expliquer par la fiabilité importante des méthodes conventionnelles d'autogreffes dans la prise en charge de la majorité des pertes osseuses maxillo-faciales et alvéolaires et leur morbidité modérée [55, 56]. La relative nouveauté, la complexité et le coût de certaines méthodes d'IT peuvent expliquer le peu de cas publiés. De plus, 8 équipes ont publié environ la moitié des articles retenus, ce qui montre qu'il existe relativement peu

Tableau I. Chirurgie osseuse reconstructrice maxillaire ou mandibulaire. [ADSC-OB : cellules mésenchymateuses issues de tissu adipeux, induites vers un phénotype ostéoblastique ; HA-TCP : hydroxyapatite – phosphate tricalcique ; PRP : plasma riche en plaquettes ; HBMSC-OB : cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse, induites vers un phénotype ostéoblastique ; rhBMP-2 : bone morphogenetic protein -2 (recombinante) ; rhBMP-7 : bone morphogenetic protein -7 (recombinante)].
Table I. Maxilla and mandible bone reconstruction. [ADSC-OB: adipose derived stromal cells, induced to osteoblastic phenotype; HA-TCP: hydroxyapatite - tricalcium phosphate; HBMSC-OB: human bone marrow stromal cells, induced to osteoblastic phenotype; PRP: platelet rich plasma; rhBMP-2: bone morphogenetic protein -2 (recombinant); rhBMP-7: bone morphogenetic protein -7 (recombinant)].

Référence	Type d'étude	Cause et localisation du défaut osseux	Scaffold	Cellules	Facteurs de Croissance	Maturation	Résultats
5	1 cas	Améloblastome Mandibule	Dacron-polyuréthane	Os spongieux	BMP (humaine)	*In vivo*: 4 mois (facias dorsal)	Succès partiel Survie 16 mois
10	1 cas	Améloblastome Mandibule	Allogreffe (Dynagraft®)	-	BMP (humaine)	-	Succès à 9 mois (biopsie)
11	Etude comparative non randomisée (n = 13)	Améloblastome Arme à feu Mandibule	Allogreffe (Dynagraft®)	-	BMP (bovine)	-	Succès 2 cas sur 6
12	1cas	Chirurgie orthognathique Maxillaire- Mandibule	Fibrine autologue (PRP)	-	rhBMP-7	-	Succès à 1 mois (biopsie)
6,13	1 cas	Carcinome épidermoïde Mandibule	Cage en titane CAD Blocs de Bio-Oss® Granules Bio-Oss®	Moelle osseuse	rhBMP-7	*In vivo*: 7 semaines (muscle grand dorsal)	Succès précoce mais fracture cage titane 13ème mois puis décès
9	3 cas	Ostéomyélite Fibrome cémentifiant Mandibule	Autogreffe osseuse	Autogreffe osseuse	Membranes induites	*In vivo*: 3 à 4 mois avec ciment méthylmétacrylate	Succès 4 cas
7	1 cas	Carcinome épidermoïde Mandibule	Hydroxyapatite (Pro Osteon®: corail)	-	rhBMP-7	*In vivo*: 6,5 mois (muscle grand pectoral)	Echec 6 mois perte du lambeau
14	22 cas	Kystes Mandibule	Collagène bovin (Osteovit®)	HBMSC-OB	-	*In vitro*: 3-4 jours	Succès similaire à autogreffe
15	1 cas	Carcinome épidermoïde Mandibule	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	Succès après distraction (pose 6 implants)
63	1 cas	Fibrome ossifiant Mandibule	Eponges de collagène (Helistat®) + HA-TCP	-	rhBMP-2	-	Succès après distraction (36 mois)
16	5 cas	Ostéomyélites Kyste dentigères Mandibule	Eponges de collagène +/- allogreffe	+/- Moelle osseuse	rhBMP-2	-	Succès 3 cas sur 5
17	10 cas	Améloblastome Ostéomyélite Mandibule	Os déminéralisé (allogreffe) (Dynagraft®)	-	rhBMP-7	-	Succès à 1 an (100 %)
18	14 cas	Cancers Ostéomyélites Mandibule	Eponges de collagène	-	rhBMP-2	-	Succès 100 %
19	4 cas	Ostéoradionécrose Mandibule	HA-ßTCP	Moelle osseuse	Membranes induites	*In vivo*: 8 semaines avec ciment méthylmétacrylate	Succès 2 cas sur 4
20	1 cas	Péri-implantite Mandibule	Polycaprolcatone	-	rhBMP-2	-	Succès (implants à 6 mois)
4	1 cas	Kératokyste Maxillaire	ßTCP	ADSC-OB	rhBMP-2	*In vivo:* 8 mois (muscle grand droit adbominal)	Succès: implants après 4 mois
8	1 cas	Ostéomyélite Mandibule	ßTCP	Moelle osseuse		*In vivo*: 6 mois (muscle grand dorsal)	Succès à 12 mois
21	1 cas	Hémangiome Mandibule	Os autogène lyophilisé + colle de fibrine	HBMSC-OB	-	-	Succès (3 interventions + distraction)

Tableau II. Chirurgie osseuse reconstructrice pour les fentes faciales. [HBMSC : cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse ; HBMSC-OB : cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse, induites vers un phénotype ostéoblastique ; PRP : plasma riche en plaquettes ; rhBMP-2 : bone morphogenetic protein -2 (recombinante)].
Table II. Facial clefts bone reconstruction. [HBMSC: human bone marrow stromal cells; HBMSC-OB: human bone marrow stromal cells, induced to osteoblastic phenotype; PRP: platelet rich plasma; rhBMP-2: bone morphogenetic protein -2 (recombinant)].

Référence	Type d'étude	Objectif	Scaffold	Cellules	Facteurs de croissance	Maturation	Résultats
25, 26	1 cas	Reconstruction fente faciale complexe + hypoplasie mandibulaire	Eponge de collagène (Helistat®)	-	rhBMP-2	-	Suivi 4,5 ans Reconstruction partielle
30	50 cas	Réparation fentes par rhBMP-2, sans autogreffe	Eponge de collagène	-	rhBMP-2	-	Succès 49/50 +/- distraction
27	1 cas	Reconstruction fente alvéolo-palatine	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	Régénération 79 % du défaut
28	1 cas	Reconstruction fente alvéolo-palatine	Eponge de collagène (Ostéovit®)	HBMSC	-	3 à 4 jours	Fermeture complète fente (Rx 18 mois)
29	2 cas	Reconstruction fente alvéolo-palatine	Os déminéralisé + sulfate de calcium (Osteoset ®)	HBMSC-OB	-	-	Régénération 66 % et 75 % du défaut

de groupes utilisant l'IT en reconstruction osseuse maxillo-faciale.

Deux paramètres sur quatre définissant l'IT étaient nécessaires pour retenir un article (scaffold/cellules/facteurs de croissance/maturation *in vivo* ou *in vitro*). La notion de manipulation est indispensable car elle sous-entend une organisation des rapports entre les différents composants, afin de contrôler la maturation et la régénération tissulaire [1]. Les études utilisant le PRP ou le PRF comme facteurs de croissance n'ont pas été retenues car des controverses persistent sur l'effet ostéo-inducteur réel de ces produits [57]. Les méthodes de préparation varient et les résultats sont parfois très différents en fonction du protocole utilisé [58]. Cependant, les articles utilisant le PRP comme scaffold ont été inclus.

L'intérêt de l'IT en chirurgie buccale et maxillo-faciale est fonction de l'indication.

Dans la reconstruction mandibulaire, la principale limite des méthodes conventionnelles de reconstruction (lambeaux autologues libres ou pédiculés) est la mauvaise vascularisation locale des greffons. Elle résulte des caractéristiques anatomiques locales (vascularisation terminale) et de la radiothérapie qui altère de façon durable la vascularisation locale et la composante cellulaire du tissu osseux. L'objectif principal de l'IT dans la reconstruction mandibulaire est la prévascularisation et la précellularisation des greffons. La méthode de maturation *in vivo* des PIT a permis dans plusieurs cas de rétablir une néovascularisation qui a persisté après implantation (Tab. I). Dans le traitement des fentes faciales et dans la régénération osseuse pré-implantaire et parodontale, c'est essentiellement la morbidité liée au site donneur d'os autogène qui a motivé le recours à l'IT (Tab. II et III) [59]. Il faut remarquer que 51 des 55 cas de fentes faciales traités par ingénierie tissulaire provenaient de la même équipe [25,26,30], ce qui montre que l'IT reste marginale dans cette indication.

Les scaffolds utilisés dans les cas de reconstruction mandibulaire étaient des phosphates de calcium (os bovin déprotéiné, HA, HA-TCP, ßTCP) stabilisés par des vis d'ostéosynthèse [7] ou par des cages en titane préformées [4, 6, 8]. Dans le cas publié par Orringer et al. [5], l'absence de propriétés mécaniques du scaffold (membranes de dacron imprégnées de BMP) n'a pas permis de contrôler la morphologie de la reconstruction, ce qui a compliqué la réhabilitation prothétique de la patiente. Les complications observées par Warnke et al. [6] et de Heliotis et al. [7] sont également directement en rapport avec une défaillance du scaffold (fracture de la cage en titane ou difficultés de fixation du matériau). La résistance mécanique et la stabilité immédiate des reconstructions sont donc un point crucial pour le succès de l'IT en chirurgie maxillo-faciale.

Dans les fentes faciales, des matériaux injectables ou très malléables ont été choisis (fibrine, collagène), afin de faciliter leur insertion.

Dans les régénérations osseuses pré-implantaires, les scaffolds étaient très variés (fibrine, collagène, PLGA, phosphates de calcium). Ils avaient globalement des propriétés mécaniques modérées.

Des ostéoblastes dérivés de moelle osseuse (3 cas) ou de tissu adipeux (1 cas), ensemencés dans des scaffolds, ont été utilisés dans les reconstructions mandibulaires. Ces cas ne confirment pas réellement l'intérêt de l'association cellules-scaffold dans cette indication. Le recours aux cellules complique la procédure (prélèvement, culture cellulaire et ensemencement) et allonge la durée globale de la reconstruction. L'utilisation des cellules semble plus pertinente en présence de facteurs de croissance.

Dans la reconstruction des fentes faciales, les cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse induites ou non vers un phénotype ostéoblastique ont été utilisées dans quatre cas

Tableau III. Chirurgie osseuse reconstructrice pré-implantaire. [ADSC-OB : cellules mésenchymateuses issues de tissu adipeux, induites vers un phénotype ostéoblastique ; DPC-OB : cellules de la pulpe dentaire induites vers un phénotype ostéoblastique ; GDF-5 : growth and differenciation factor -5 ; HA : hydroxyapatite ; HA-TCP : hydroxyapatite - phosphate tricalcique ; HBMSC : cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse ; HBMSC-OB : cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse, induites vers un phénotype ostéoblastique ; PDSC-OB : cellules mésenchymateuses issues du périoste, induites vers un phénotype ostéoblastique ; PLGA : copolymère acide polyglycolique + acide polylactique ; PRP : plasma riche en plaquettes ; rhBMP-2 : bone morphogenetic protein -2 (recombinante) ; ROG : régénération osseuse guidée].
Table III. Bone reconstruction for dental implant surgery. [ADSC-OB: adipose derived stromal cells, induced to osteoblastic phenotype; DPC-OB: dental pulp cells, induced to osteoblastic phenotype; GDF-5: growth and differenciation factor 5; HA: hydroxyapatite; HA-TCP: hydroxyapatite - tricalcium phosphate; HBMSC-OB: human bone marrow stromal cells, induced to osteoblastic phenotype; HBMSC-OB: human bone marrow stromal cells; PDSC-OB: periosteal derived stromal cells, induced to osteoblastic phenotype; PLGA: poly (lactic-co-glycolic acid); PRP: platelet rich plasma; rhBMP-2: bone morphogenetic protein -2 (recombinant); ROG: guided bone regeneration].

Référence	Type d'étude	Objectif	Scaffold	Cellules	Facteurs de Croissance	Maturation	Résultats
49	Etude prospective non contrôlée (*n* = 12)	Sécurité et efficacité des BMPs pour ROG pré-implantaire	Éponge de collagène	-	rhBMP-2	-	Pas d'effet néfaste local ou général des BMPs Succès implantaire à 3 ans
50	Etude contrôlée randomisée (*n* = 11, 34 implants)	Intérêt de l'ajout de BMP pour ROG péri-implantaire	BioOss®	-	rhBMP-2	-	Augmentation volume os néoformé et diminution durée cicatrisation avec rhBMP-2
35	2 cas	Sinus lift par IT	Membrane Ethisorb® + fibrine (Tissucoll®)	PDSC-OB	-	I*n vitro*: 1 semaine	Succès (Rx + biopsie) Insertion des implants à 4 mois
36	Etude prospective non contrôlée (*n* = 27)	Sinus lift par IT	Membrane Ethisorb®	PDSC-OB	-	I*n vitro*: 1 semaine	Succès 18 cas Echec 9 cas
52	3 cas	ROG péri-implantaire par substitut IT injectable	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	Succès sur 3 cas (10 implants)
51	Etude contrôlée randomisée (*n* = 48)	Détermination de la concentration nécessaire de rhBMP2 pour sinus lift	Éponge de collagène (Helistat®)	-	rhBMP-2	-	BMP-2: 80 % succès Concentration BMP-2 idéale = 1,5 mg/ml
37	1 cas	Augmentation osseuse transversale mandibule	PLGA (Vicryl); Protocole Bioseed®	PDSC-OB	-	*In vitro*: 5 semaines puis greffe	Succès: pose 2 implants à 6 mois
38	Etude comparative non randomisée (*n* = 13)	Sinus lift	Xenogreffe (BioOss®) Eponge de collagène (Lyostypt®)	HBMSC-OB PDSC-OB	-	*In vitro*: 7 à 40 jours	IT supérieure à autogreffe
45	Etude comparative non randomisée (*n* = 20)	Comparaison résorption os autogène vs os IT dans sinus lift	PLGA (Ethicon) + fibrine (Tissucol®)	HBMSC-OB	-	*In vitro:* 6-9 jours	29 % résorption os autogène 90 % résorption os IT
43	6 cas	IT pour sinus lift	HA-TCP	HBMSC-OB	-	-	93 % succès implants dans os IT
42	12 cas	IT pour sinus lift	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	Gain 8 mm hauteur os et 100 % succès implants (*n* = 41) à 2-6 ans
41	8 cas	Défauts osseux alvéolaires transversaux et verticaux	Phosphate de calcium (Biomatrix®)	ADSC-OB		*In vitro*: 7 jours	Succès 8 cas: pose des implants à 3 mois

Tableau III. Suite.
Table III. Continued.

Référence	Type d'étude	Objectif	Scaffold	Cellules	Facteurs de Croissance	Maturation	Résultats
53	6 cas	ROG péri-implantaire	HA (Proosteon®)	HBMSC-OB	-	*In vitro*: 7 jours	1 seul cas de néo-formation osseuse par IT sur 6 patients
39	Etude contrôlée randomisée (*n* = 30)	RTG défauts osseux parodontaux	HA + Fibrine (PRP)	PDSC-OB		-	Meilleurs résultats avec IT (gain d'attache clinique et comblement défauts infra-osseux)
32	3 cas	Sinus lift	Fibrine (Tissucoll®) PLGA (Ethicon)	PDSC-OB	-	*In vitro*: 21 jours	100 % Succès Os mature à 6 mois
44	14 cas	Sinus lift Greffe en onlay	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB		-	100 % Succès
40	Etude contrôlée randomisée (*n* = 7)	Régénération alvéole (38-48)	Eponges de collagène	DPC-OB (18-28)	-	-	Régénération complète des alvéoles avec IT: résultat supérieur à celui du contrôle
46	Etude prospective non contrôlée (*n* = 22)	Sinus lift	Xénogreffe (BioOss®)	HBMSC-OB	-	-	Suffisant pour pose d'implant, mais résorption à 6 et 12 mois
33	5 cas	Sinus lift (comparaison Biocoral® seul vs IT)	PLGA (Ethisorb®)	HBMSC-OB	-	*In vitro*: 6 à 9 jours	Succès des 2 techniques mais densité supérieure avec HA
31	Etude prospective contrôlée randomisée (*n* = 160)	Sinus lift: (autogreffe vs IT)	Eponge de collagène	-	rh-BMP-2	-	Reconstruction osseuse équivalente avec les 2 méthodes
34	Etude prospective non contrôlée (*n* = 35)	Sinus lift: (autogreffe vs IT)	PLGA (Ethicon®)	PDSC-OB	-	8 semaines	Autogreffe + efficace que IT pour sinus lift
47	Etude contrôlée randomisée (*n* = 31)	Effet du GDF5-ßTCP sur sinus lift vs ßTCP-autogreffe	ßTCP	-	GDF-5	-	Surface de néoformation osseuse sur biopsies test = contrôle
48	1 cas	Greffe en onlay sans os autogène	TCP (Vitoss®)	-	rhBMP-2		Succès: pose de 6 implants après 4 mois

avec succès. Cependant, la grande variabilité des tableaux cliniques et le peu de cas publiés ne permettent pas de conclure à un apport particulier des cellules autologues dans cette indication.

Dans la régénération osseuse pré-implantaire ou parodontale, les cellules autologues ont été utilisées dans 17 cas sur 22. Dans 7 études [32, 34–39], les ostéoblastes étaient issus d'un prélèvement de périoste, ce qui va dans le sens de procédures moins invasives (prélèvement buccal des cellules souches et amplification *in vitro*). Dans plusieurs cas, les cellules souches mésenchymateuses (d'origine médullaire, périostée ou pulpaire) induites vers un phénotype ostéoblastique ont permis d'obtenir une régénération osseuse significative (sinus lift [33], alvéoles d'extraction [40], augmentation transversale de la crête alvéolaire [37, 41], régénération péri-implantaire [42] ou poches parodontales [39]). Les caractéristiques communes de ces défauts osseux sont d'une part leur volume limité et d'autre part l'absence de contraintes mécaniques appliquées pendant la cicatrisation. Plusieurs études rapportent des taux de succès implantaires proches de 100 % [32, 35, 42–44] après des comblements sinusiens par des PIT.

Cependant, les résultats cliniques de l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses autologues sont inconstants. Ainsi, plusieurs études utilisant des hydrogels cellularisés pour greffer des sinus ont révélé les limites de cette approche pour des comblements de volume important, en raison de la limite de diffusion de l'oxygène et des nutriments au sein

des scaffolds [34, 36]. D'autre part, la résorption des volumes greffés par IT est parfois aussi importante, voire plus qu'avec l'os autogène [45, 46]. Cela pourrait être lié à un temps de cicatrisation trop court ou bien à un volume initial très important avec peu d'os résiduel.

Les différences interindividuelles importantes concernant la quantité et la qualité des cellules souches mésenchymateuses peuvent aussi expliquer ces résultats inconstants. Enfin, toutes les sources de cellules mésenchymateuses ne sont pas équivalentes [60].

Les BMPs sont des protéines de la famille du TGFß qui jouent un rôle dans le recrutement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes [61]. L'utilisation des BMP-2 et BMP-7 recombinantes a reçu une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis et en Europe pour des indications bien précises en orthopédie (fractures ouvertes de la jambe, arthrodèses vertébrales), après plusieurs études prospectives chez l'Homme [62]. En chirurgie maxillo-faciale, quelques rapports de cas ont montré l'intérêt des BMPs dans la reconstruction mandibulaire après de larges résections osseuses [10, 17, 63], en complément dans la chirurgie orthognathique [12] ou après des ostéomyélites [16–18, 20]. Dans ces cas, des éponges de collagène, des allogreffes ou de la colle de fibrine étaient utilisés pour apporter sur le site les facteurs de croissance. Des taux de succès importants sont décrits, avec une grande quantité d'os néoformé de forte densité. La consolidation osseuse clinique apparaît rapidement (1 à 6 mois), même après radiothérapie ou lors d'une ostéomyélite [16–18]. Dans tous les cas de maturation *in vivo*, les BMPs (humaine, rhBMP-2, rhBMP-7) ont été utilisées en complément du scaffold pour favoriser le recrutement des cellules mésenchymateuses et leur différenciation en ostéoblastes. On remarque que les BMPs sont utilisées systématiquement dans les cas les plus difficiles de reconstruction osseuse (lésions étendues, terrain défavorable).

La principale complication rapportée de l'utilisation des BMPs est un œdème persistant plusieurs semaines après implantation dans quelques cas [16]. Certains essais ont décrit des taux d'échecs importants qui étaient liés à un manque de pureté des protéines utilisées (origine bovine) [11], à des difficultés opératoires ou à des scaffolds mal adaptés [16]. Les limites à l'utilisation des BMPs sont leur risque supposé de dissémination à distance du site d'implantation qui pourrait provoquer des proliférations cellulaires non contrôlées. Des stratégies de couplage des facteurs de croissance aux scaffolds ont été développées pour obtenir un effet strictement local [47]. Le coût important de ces traitements constitue également un obstacle pour une utilisation plus large.

La série de Chin et al. présente 50 cas de fentes labiales, palatines et faciales traitées par des éponges de collagène imprégnées de rhBMP-2 et par distraction osseuse. Un taux de succès de 98 % (49 reconstructions osseuses sur 50) [30] est décrit, sans aucune autogreffe osseuse, ce qui a réduit de façon importante la morbidité. Cependant, des études randomisées à plus grande échelle sont nécessaires pour valider l'innocuité de ce protocole à long terme.

Dans les reconstructions pré-implantaires, l'utilisation de rhBMP-2 semble très efficace au niveau des sinus maxillaires [31, 48], mais également dans les greffes d'apposition [48, 49] et dans le comblement des ostéolyses péri-implantaires [50]. La néoformation osseuse est rapide et se fait en grande quantité, de façon équivalente ou supérieure aux autogreffes [31]. Dans une étude prospective randomisée, la concentration efficace de rhBMP-2 en imprégnation d'éponges de collagène pour la régénération osseuse dans les sinus maxillaires a été évaluée à 1,5 mg/mL [51]. Dans une autre étude contrôlée randomisée pour le comblement de sinus, le greffage de rhGDF-5 sur un phosphate de calcium (ßTCP) était équivalent au ßTCP non greffé associé à de l'os autogène [47]. Dans une étude prospective portant sur trois ans, concernant dix patients traités pour régénération osseuse pré-implantaire par des éponges de collagène imprégnées de rhBMP-2, aucune complication locale ou générale en rapport avec les BMPs n'a été observée [49].

Les BMPs ont été utilisées plus souvent dans les reconstructions mandibulaires que dans les régénérations osseuses pré-implantaires. Pour les reconstructions mandibulaires, les BMPs étaient utilisées en dernier recours, lorsque les méthodes conventionnelles (lambeaux) avaient échoué. Le bénéfice attendu de ces molécules était donc supérieur au risque éventuel lié à leur utilisation. Dans le cas des reconstructions pré-implantaires, les solutions alternatives plus invasives (greffes autologues) peuvent être préférables au risque éventuel encouru par l'utilisation de BMPs. De plus, le coût important de ces traitements constitue un frein à leur utilisation lorsque des solutions alternatives existent.

Deux méthodes de maturation différentes peuvent être utilisées en fonction de l'objectif recherché.

La maturation *in vitro* de courte durée (entre 4 et 7 jours) a été utilisée dans 1 cas pour la reconstruction mandibulaire, dans 1 cas pour la reconstruction de fentes faciales et dans 7 cas dans les régénérations osseuses pré-implantaires. Le but de cette étape était l'adhésion et la prolifération des cellules autologues sur le scaffold avant implantation. Dans certains cas, le temps de maturation *in vitro* était plus long (3 à 8 semaines) afin de permettre la sécrétion de la matrice extracellulaire et sa minéralisation. La maturation *in vitro* est donc essentiellement utilisée pour les PIT dans la régénération pré-implantaire parce qu'elle est peu invasive et que l'on recherche surtout un ensemencement des cellules du scaffold. Dans tous les cas, la maturation *in vitro* des PIT était faite en conditions statiques : il est probable que l'utilisation de bioréacteurs (conditions de culture dynamiques) pourrait améliorer la quantité et la répartition des cellules ensemencées dans les scaffolds, avec de meilleurs résultats cliniques [64].

À l'inverse, la maturation *in vivo* a uniquement été utilisée dans des reconstructions mandibulaires étendues car elle est beaucoup plus invasive et que l'objectif recherché est la mise en place d'une vascularisation du PIT avant implantation sur le site à reconstruire. Les cinq cas publiés ont tous abouti au développement d'une néovascularisation, objectivée par les examens complémentaires (scintigraphie ou angioscanner) après 2 à 8 mois de maturation, et confirmée *in situ* lors du

transfert du lambeau. Le site de maturation *in vivo* était systématiquement au contact d'un muscle, dans une zone très vascularisée non concernée par les traitements antérieurs. Les conditions locales et générales du patient ont également une influence importante sur la cicatrisation. Après exérèse d'un kyste épidermoïde maxillaire récidivant, traité sans radiothérapie, Mesimäki et al. [4] ont obtenu une reconstruction mandibulaire satisfaisante mais Warnke et al. [6] rapportent un échec partiel dans la reconstruction mandibulaire après un cancer, traité par radiothérapie, chez un patient alcoolotabagique partiellement sevré.

La prévascularisation semble donc être une technique prometteuse dans les cas où les méthodes conventionnelles sont inefficaces en raison de conditions locales défaillantes et d'une insuffisance de la perfusion sanguine.

Dans deux études, la méthode des membranes induites a été utilisée pour une reconstruction mandibulaire. Le principal effet de la membrane est celui de mainteneur d'espace alors que les effets sur la prévention de la résorption du greffon et la sécrétion de facteurs ostéo-inducteurs par la membrane sont encore discutés [22,65]. L'état tissulaire local antérieur a également une influence sur le succès de cette technique car les suites opératoires ont été plus favorables avec les ostéomyélites (100 % de succès) [9] qu'avec les ostéoradionécroses (50 % de succès) [19].

Conclusion

Les applications de l'ingénierie tissulaire osseuse chez l'homme dans la sphère buccale et maxillo-faciale sont encore limitées et restent largement dans le champ de la recherche. L'IT présente deux indications principales dans ce domaine, avec des objectifs et des protocoles de traitement très différents.

Dans la reconstruction mandibulaire, les objectifs principaux sont la vascularisation du greffon mais également la stabilité primaire et la résistance mécanique à court terme des reconstructions. Les cas traités par IT étaient tous en échec thérapeutique avec les techniques conventionnelles. Des scaffolds mécaniquement résistants sont utilisés, avec des BMPs et éventuellement des méthodes de prévascularisation *in vivo*. Les cellules sont rarement utilisées dans cette indication car les résultats sont moins prédictibles qu'avec les BMPs. Les premières séries de cas de reconstruction mandibulaire ont montré des résultats encourageants mais des études complémentaires, comportant plus de cas, sont nécessaires pour confirmer ces premiers résultats.

À l'inverse, dans la régénération osseuse pré-implantaire, on recherche une moindre invasivité des procédures chirurgicales, notamment pour éliminer la morbidité des prélèvements d'autogreffes, tout en limitant le recours à des molécules aux effets secondaires potentiellement importants (BMPs). Les scaffolds n'ont pas besoin d'avoir une grande résistance mécanique mais ils doivent être malléables. Ils sont le plus souvent cellularisés *in vitro* avant implantation et les BMPs sont rarement utilisées. Dans cette seconde indication, l'ingénierie tissulaire a déjà montré des résultats similaires à ceux des méthodes classiques, ce qui ouvre la voie à des protocoles chirurgicaux moins invasifs.

Conflits d'intérêt : aucun

Remerciements. Les auteurs remercient l'Institut français pour la recherche odontologique (IFRO) pour son soutien financier.

Références

1. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. Science 1993;260:920-6.
2. Lee KH. Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application. Yonsei Med J 2000;41:774-9.
3. Badylak SF, Nerem RM. Progress in tissue engineering and regenerative medicine. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107:3285-6.
4. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, Miettinen S, Suururonen R. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. Int J Oral Maxillofac Surg 2009;38:201-9.
5. Orringer JS, Shaw WW, Borud LJ, Freymiller EG, Wang SA, Markowitz BL. Total mandibular and lower lip reconstruction with a prefabricated osteocutaneous free flap. Plast Reconstr Surg 1999;104:793-7.
6. Warnke PH, Springer ING, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PAJ, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. Lancet 2004;364:766-70.
7. Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U, Tsiridis E, Di Silvio L. Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. Int J Oral Maxillofac Surg 2006;35:265-9.
8. Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, Bornmann KH, Rücker M, Gellrich NC. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. Int J Oral Maxillofac Surg 2010;39:379-87.
9. Goodger N, Wang J, Smagalski G, Hepworth B. Methylmethacrylate as a space maintainer in mandibular reconstruction. J Oral Maxillofac Surg 2005;63:1048-51.
10. Moghadam HG, Urist MR, Sandor GK, Clokie CM. Successful mandibular reconstruction using a BMP bioimplant. J Craniofac Surg 2001;12:119-27.
11. Ferretti C, Ripamonti U. Human segmental mandibular defects treated with naturally derived bone morphogenetic proteins. J Craniofac Surg 2002;13:434-44.
12. Warnke PH, Coren AJ. First experiences with recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1) in a human case in maxillofacial surgery. Plast Reconstr Surg 2003;111:2471-2.
13. Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, Acil Y, Bolte H, Kosmahl M, Russo P, Sherry E, Lützen U, Wolfart S, Terheyden H. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. Biomaterials 2006;27:3163-7.

14. Pradel W, Eckelt U, Lauer G. Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:285-90.
15. Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. Int J Oral Maxillofac Implants 2006;21:141-7.
16. Carter TG, Brar PS, Tolas A, Beirne OR. Off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for reconstruction of mandibular bone defects in humans. J Oral Maxillofac Surg 2008; 66:1417-25.
17. Clokie CML, Sándor GKB. Reconstruction of 10 major mandibular defects using bioimplants containing BMP-7. J Can Dent Assoc 2008;74:67-72.
18. Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). J Oral Maxillofac Surg 2008;66:616-24.
19. Zwetyenga N, Catros S, Emparanza A, Deminiere C, Siberchicot F, Fricain JC. Mandibular reconstruction using induced membranes with autologous cancellous bone graft and HA-betaTCP: animal model study and preliminary results in patients. Int J Oral Maxillofac Surg 2009;38:1289-97.
20. Schuckert K, Jopp S, Teoh S. Mandibular defect reconstruction using three-dimensional polycaprolactone scaffold in combination with platelet-rich plasma and recombinant human bone morphogenetic protein-2: de novo synthesis of bone in a single case. Tissue Eng Part A 2009;15:493-9.
21. Lee J, Sung H, Jang J, Park Y, Min S, Kim E. Successful reconstruction of 15-cm segmental defects by bone marrow stem cells and resected autogenous bone graft in central hemangioma. J Oral Maxillofac Surg 2010;68:188-94.
22. Catros S, Zwetyenga N, Bareille R, Brouillaud B, Renard M, Amédée J, Fricain JC. Subcutaneous induced membranes have no osteoinductive effect on macroporous ha-TCP in vivo. J Orthop Res 2008;27:155-61.
23. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. Ann Chir Plast Esthet 2000;45:346-53.
24. Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. Orthop Clin North Am 2010;41:27-37.
25. Carstens MH, Chin M, Ng T, Tom WK. Reconstruction of #7 facial cleft with distraction-assisted in situ osteogenesis (DISO): role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with Helistat-activated collagen implant. J Craniofac Surg 2005;16:1023-32.
26. Tom WK, Chin M, Ng T, Bouchoucha S, Carstens M. Distraction of rhBMP-2-generated mandible: how stable is the engineered bone in response to subsequent surgeries? J Oral Maxillofac Surg 2008;66:1499-505.
27. Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. Int J Oral Maxillofac Surg 2006;35:551-5.
28. Pradel W, Tausche E, Gollogly J, Lauer G. Spontaneous tooth eruption after alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered bone: a case report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;105:440-4.
29. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, Atashi R. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108:e1-6.
30. Chin M, Ng T, Tom WK, Carstens M. Repair of alveolar clefts with recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) in patients with clefts. J Craniofac Surg 2005;16:778-89.
31. Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, Boyne PJ. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. J Oral Maxillofac Surg 2009;67:1947-60.
32. Beaumont C, Schmidt RJ, Tatakis DN, Zafiropoulos G. Use of engineered bone for sinus augmentation. J Periodontol 2008;79:541-8.
33. Mangano C, Piattelli A, Mangano A, Mangano F, Mangano A, Iezzi G, Borges F, d'Avila S, Shibli J. Combining scaffolds and osteogenic cells in regenerative bone surgery: a preliminary histological report in human maxillary sinus augmentation. Clin Implant Dent Relat Res 2009;11:e92-102.
34. Voss P, Sauerbier S, Wiedmann-Al-Ahmad M, Zizelmann C, Stricker A, Schmelzeisen R, Gutwald R. Bone regeneration in sinus lifts: comparing tissue-engineered bone and iliac bone. Br J Oral Maxillofac Surg 2010;48:121-6.
35. Schmelzeisen R, Schimming R, Sittinger M. Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report. J Craniomaxillofac Surg 2003;31:34-9.
36. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. J Oral Maxillofac Surg 2004;62:724-9.
37. Strietzel FP. Tissue-engineered bone for lateral alveolar ridge augmentation: a case report. Int J Oral Maxillofac Implants 2006;21:131-5.
38. Springer IN, Nocini PF, Schlegel KA, De Santis D, Park J, Warnke PH, Terheyden H, Zimmermann R, Chiarini L, Gardner K, Ferrari F, Wiltfang J. Two techniques for the preparation of cell-scaffold constructs suitable for sinus augmentation: steps into clinical application. Tissue Eng 2006;12:2649-56.
39. Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. J Periodontol 2008;79:811-8.
40. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. Eur Cell Mater 2009;18:75-83.
41. Kulakov AA, Goldshtein DV, Grigoryan AS, Rzhaninova AA, Alekseeva IS, Arutyunyan IV, Volkov AV. Clinical study of the efficiency of combined cell transplant on the basis of multipotent mesenchymal stromal adipose tissue cells in patients with pronounced deficit of the maxillary and mandibulary bone tissue. Bull Exp Biol Med 2008;146:522-5.
42. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Kohgo T, Hibi H, Nagasaka T, Ueda M. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6-year follow-up. Tissue Eng Part A 2008;14:1699-707.
43. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;106:203-9.
44. Ueda M, Yamada Y, Kagami H, Hibi H. Injectable bone applied for ridge augmentation and dental implant placement: human progress study. Implant Dent 2008;17:82-90.

45. Zizelmann C, Schoen R, Metzger MC, Schmelzeisen R, Schramm A, Dott B, Bormann K, Gellrich N. Bone formation after sinus augmentation with engineered bone. Clin Oral Implants Res 2007;18:69-73.
46. Fuerst G, Strbac GD, Vasak C, Tangl S, Leber J, Gahleitner A, Gruber R, Watzek G. Are culture-expanded autogenous bone cells a clinically reliable option for sinus grafting? Clin Oral Implants Res 2009;20:135-9.
47. Koch FP, Becker J, Terheyden H, Capsius B, Wagner W. A prospective, randomized pilot study on the safety and efficacy of recombinant human growth and differentiation factor-5 coated onto beta-tricalcium phosphate for sinus lift augmentation. Clin Oral Implants Res 2010 Jun 8 [Epub ahead of print].
48. Schuckert K, Jopp S, Osadnik M. Modern bone regeneration instead of bone transplantation: a combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and platelet-rich plasma for the vertical augmentation of the maxillary bone-A single case report. Tissue Eng Part C Methods 2010 Apr 26 [Epub ahead of print].
49. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. J Periodontol 2000;71:1241-57.
50. Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle CHF, Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. Clin Oral Implants Res 2003;14:556-68.
51. Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, Triplett RG. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. J Oral Maxillofac Surg 2005;63:1693-707.
52. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. Cell Transplant 2004;13:343-55.
53. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. Biomaterials 2008;29:3053-61.
54. Haute Autorité de Santé. Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations 2000.
55. Baqain ZH, Anabtawi M, Karaky AA, Malkawi Z. Morbidity from anterior iliac crest bone harvesting for secondary alveolar bone grafting: an outcome assessment study. J Oral Maxillofac Surg 2009;67:570-5.
56. Schaaf H, Lendeckel S, Howaldt H, Streckbein P. Donor site morbidity after bone harvesting from the anterior iliac crest. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;109:52-8.
57. Boyapati L, Wang H. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. Implant Dent 2006;15:160-70.
58. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004;62:489-96.
59. Gimbel M, Ashley RK, Sisodia M, Gabbay JS, Wasson KL, Heller J, Wilson L, Kawamoto H, Bradley J. Repair of alveolar cleft defects: reduced morbidity with bone marrow stem cells in a resorbable matrix. J Craniofac Surg 2007;18:895-901.
60. Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human bone-marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. Stem Cells Dev 2010; sous presse.
61. Ebara S, Nakayama K. Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity. Spine 2002;27:S10-5.
62. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Börner MG, Chiron P, Choong P, Cinats J, Courtenay B, Feibel R, Geulette B, Gravel C, Haas N, Raschke M, Hammacher E, van der Velde D, Hardy P, Holt M, Josten C, Ketterl RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reynders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Rüter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. J Bone Joint Surg Am 2002;84:2123-34.
63. Chao M, Donovan T, Sotelo C, Carstens MH. In situ osteogenesis of hemimandible with rhBMP-2 in a 9-year-old boy: osteoinduction via stem cell concentration. J Craniofac Surg 2006;17:405-12.
64. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol 2004;22:80-6.
65. Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. J Orthop Res 2004;22:73-9.

Elsevier Editorial System(tm) for Acta Biomaterialia
Manuscript Draft

Manuscript Number: AB-10-969

Title: Laser-Assisted Bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite

Article Type: Full Length Article

Keywords: Laser-Assisted Bioprinting; biofabrication; nanohydroxyapatite; human osteoprogenitor cells; cell patterning

Corresponding Author: Dr Sylvain Catros, DDS

Corresponding Author's Institution: INSERM U577, Victor Segalen Bordeaux 2 University

First Author: Sylvain Catros, DDS

Order of Authors: Sylvain Catros, DDS; Jean Christophe Fricain, DDS, PhD; Bertrand Guillotin, PhD; Benjamin Pippenger; Reine Bareille, PhD; Murielle Rémy, PhD; eric lebraud; Bernard Desbats, PhD; Joëlle Amédée, PhD; Fabien Guillemot, PhD

Abstract: In tissue engineering, developing tools to reproduce and manipulate the cell micro-environment, including the location and shape of cell patterns, is essential. Parallel to inkjet printing and pressure-operated mechanical extruders, the laser-assisted bioprinting (LAB) has emerged as an alternative technology to fabricate 2 and 3 dimensional tissue engineering products.
The objective of this work was to determine laser printing parameters for patterning and assembling nano-hydroxyapatite and Human Osteo Progenitors in 2 and 3 dimensions with the LAB.
The Laser Assisted Bioprinting (LAB) dedicated workstation used in this study comprised an infra red laser (λ=1064 nm, 30 ns), focused on a quartz ribbon that was coated with a thin absorbing layer of titanium (60nm) and a 20-30µm thick layer of bio-ink. Scanning system, quartz ribbon and substrate were piloted by a dedicated software, allowing the sequential printing of different biological materials into 2 and/or 3 dimensions.
Nano-hydroxyapatite printing material (bio-ink) was synthesized by chemical precipitation and was characterized prior and following printing using Transmission Electron Microscopy (TEM), Fourier Transformed Infra Red spectroscopy (FTIR) and X-Ray Diffraction (XRD). Human Osteo-Progenitors (HOPs) bioink was prepared using a 30 millions cells/ml suspension in culture medium and cells were characterized after printing using Live/Dead Assay and Osteoblastic Phenotype markers (Alcaline Phosphatase and Osteocalcin).
The results revealed that LAB allows to print and organize nHA and HOPs in 2 and 3 dimensions. LAB did not alter the physico-chemical properties of nHA, nor the viability, proliferation and phenotype (Alcaline Phosphatase, Osteocalcin) of HOPs over time (up to 15 days). This study has demonstrated that LAB is a relevant method for patterning nHA and osteoblastic cells in 2D, but is also adapted to the bio-fabrication of 3D composite materials.

Text only
Click here to view linked References

Title: Laser-Assisted Bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite

Authors: Sylvain Catros[1,2,*], Jean-Christophe Fricain[1,2], Bertrand Guillotin[1], Benjamin Pippenger[1], Reine Bareille[1], Murielle Remy[1] Eric Lebraud[3], Bernard Desbats[4], Joëlle Amédée[1] and Fabien Guillemot[1]

Affiliations:

*** Corresponding author:** Sylvain Catros / Address: Inserm U577, Université Victor Segalen Bordeaux 2 / Zone Nord, Bât 4A – case postale 45 / 146, rue Léo-Saignat / 33076 Bordeaux cedex / France / tel: + 33 5 57 57 14 88 / fax: + 33 5 56 90 05 17 / sylvaincatros@hotmail.com

1: INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France, Univ. Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076 France

2: Dental Faculty, Univ. Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076 France

3: CNRS, Université de Bordeaux, I.C.M.C.B., 87 Avenue du Dr A. Schweitzer, 33608 Pessac cedex, France

4: CBMN UMR-CNRS 5248, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France

Abstract

In tissue engineering, developing tools to reproduce and manipulate the cell micro-environment, including the location and shape of cell patterns, is essential. Parallel to inkjet printing and pressure-operated mechanical extruders, the laser-assisted bioprinting (LAB) has emerged as an alternative technology to fabricate 2 and 3 dimensional tissue engineering products.

The objective of this work was to determine laser printing parameters for patterning and assembling nano-hydroxyapatite (nHA) and Human Osteo Progenitors (HOPs) in 2 and 3 dimensions with the LAB.

The Laser Assisted Bioprinting (LAB) workstation used in this study comprised an infrared laser focused on a quartz ribbon that was coated with a thin absorbing layer of titanium and a layer of bio-ink. Scanning system, quartz ribbon and substrate were piloted by dedicated software, allowing the sequential printing of different biological materials into 2 and/or 3 dimensions.

N-HA printing material (bio-ink) was synthesized by chemical precipitation and was characterized prior and following printing using Transmission Electron Microscopy, Fourier Transformed Infra Red spectroscopy and X-Ray Diffraction. HOPs bioink was prepared using a 30 millions cells/ml suspension in culture medium and cells were characterized after printing using Live/Dead Assay and Osteoblastic Phenotype markers (Alcaline Phosphatase and Osteocalcin).

The results revealed that LAB allows printing and organizing nHA and HOPs in 2 and 3 dimensions. LAB did not alter the physico-chemical properties of nHA, nor the viability, proliferation and phenotype of HOPs over time (up to 15 days). This study has demonstrated that LAB is a relevant method for patterning nHA and osteoblastic cells in 2D, but is also adapted to the bio-fabrication of 3D composite materials.

Keywords:

- Laser-Assisted Bioprinting
- Biofabrication
- Nanohydroxyapatite
- Human osteoprogenitor cells
- Cell patterning

1 Introduction

Despite tremendous efforts to design sophisticated scaffolds and bioreactor-assisted maturation procedures, scaffold-based approaches in Tissue Engineering still suffer from several limitations. These limitations result from the difficulty to reproduce the complex interactions which govern cell fate and effective regeneration of a functional tissue. Coordinated interactions between soluble factors, cells [1], and extracellular matrices define a local biochemical and mechanical micro-environment [2,3] with complex and dynamic regulation that cells sense [3-5]. During tissue development, most mechanisms of pattern formation are based on spatio-temporal heterogeneity inducing the formation of the local environment (i.e. local gradients of soluble or insoluble factors, local streams of physical forces). This suggests a dynamic reciprocity of form and function [6,7] and highlights the importance of shaping adequate multicomponent geometries to promote proper remodeling [8,9]. Consequently, the three-dimensional organization of cells and biologically relevant components within engineered tissues may remain unpredictable [4], thus precluding the complete success of hybrid materials for clinical applications. One possible approach is to develop tools to create and manipulate the micro-environment including, for example the location and shape of biological and physicals gradients.

Some authors have suggested building three-dimensional biological structures by the technology of bioprinting: Computer-aided design and machining can be used for the patterning and assembly of living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization. Thus, bio-engineered structures serving in regenerative medicine, pharmacokinetic and basic cell biology studies can be produced [10,11]. Commercially available ink-jet printers have been successfully designed [12,13] to assemble biological structures according to a computer-aided design template (blue print). Pressure-operated mechanical extruders have also been developed to handle live cells and cell aggregates [14]. Parallel to these methods, the laser-assisted bioprinting (LAB) [15] has emerged as an alternative technology which overcomes some of the limitations of ink-jet and micro-pen

printing devices.

A typical LAB set up is basically composed of three elements: a pulsed laser source, a target coated with the material to be printed (the ribbon), and a receiving substrate. The ribbon is a multilayer component: a support, (transparent to the laser radiation wavelength), is coated with a transfer layer. This layer composed of the biological materials (biomaterials, cells, biomolecules, …) to print is named bioink. Depending on the bioink optical absorption properties and the laser wavelength, a laser absorbing interlayer is necessary to induce transfer and is hence placed between the support and the material to print. According to literature, terminology of Biological Laser Printing (BioLP) [16] or Absorbing-Film Assisted-LIFT (AFA-LIFT) [17] has been then preferred instead of Matrix Assisted Pulse Laser Evaporation – Direct Write (MAPLE-DW) [18] which underlies a direct vaporization of the first molecular layer of the liquid. Such an interlayer eliminates direct interaction between the laser beam and the bioink, since 99% of the non-reflected incident beam may be transmitted in the case of MAPLE-DW. As reviewed recently by the authors [15], LAB involves a large number of parameters for maintaining cell function after printing. Nevertheless, it has been found that the volume of deposited material depends linearly on the laser pulse energy, and that a minimum threshold has to be overcome for micro-droplet ejection to occur [19,20].

We have previously printed inorganic material like nano-hydroxyapatite (nHA) with microscale resolution [21]. The aim of this work was to determine suitable experimental conditions for creating on-demand patterns of inorganic (nHA) and living components (Human Osteo Progenitors: HOPs) involved in bone tissue engineering. The chemical and biological properties of these components were evaluated over time after printing.

2 Materials and Methods

2.1 Laser-Assisted Bioprinting set-up

The set-up for LAB was described elsewhere [15,21]. Briefly, the experimental conditions comprised a Nd:YAG infra-red laser (Spectra Physics, λ=1064 nm, 30 ns), driven by means of galvanometric mirrors (scanning system). The laser beam was focused on the ribbon made of a quartz slide coated with an absorbing interlayer of Titanium (60 nm) and a 20-30 µm thick film of bioink (Figure 1). Scanning system, quartz ribbon and substrate were piloted by a dedicated software, allowing the sequential printing of different biological materials into 2 and/or 3 dimensions. Hence, on-demand patterns of nHA and cells were printed by adjusting scanning speed, blue print features, as well as laser pulse rate and energy.

2.2 Laser Assisted Bioprinting of Nano-hydroxyapatite

2.2.1 Nano-hydroxyapatite synthesis

Nano-hydroxyapatite has been synthesized by wet chemical precipitation as described by Afshar et al [22]. Briefly, a peristaltic pump was used to add drop-by-drop 100 ml of a 0.6 M solution of Phosphoric acid (Rectapur, Prolabo®, Paris, France) in 100 ml of a 1M solution of calcium hydroxide (Alfa Aesar, Germany) under vigorous stirring at ambient temperature. At the end of reaction, pH was adjusted to 10 with sodium hydroxide and solution was stirred continuously during 12 hours.

2.2.2 Physico-chemical and morphological characterization of nano-hydroxyapatite

In order to characterize the as-obtained nanomaterials, the solution was filtered and dried overnight (70°C, 12h). The dried material was then milled with pestle and mortar. The powder has been examined by Fourier-Transformed InfraRed sprectroscopy (FTIR) (Thermo Nicolet NEXUS 670 FTIR, USA) for physico-chemical analysis. Structural properties have been analyzed by X-Ray Diffraction (XRD) using PANalytical X'pert MPD-PRO diffractometer (Bragg Brentano 2θ

geometry), working with a copper anticathod (mean λ Kα = 1,5418 Å), a 40 kV tension and a 40 mA intensity. Morphological observations of crystallites have been performed using a Transmission Electron Microscope (TEM) (Philips® Tecnai 12) working at 80 keV, after deposition of sonicated solution onto carbon grids. Scanning Electron Microscopy (SEM) observations of the powder have been done after gold sputtering using a Hitachi® S-2500 microscope (Tokyo, Japan), working at 10 keV.

2.2.3 Preparation of nano-hydroxyapatite printing ink

Nano-hydroxyapatite printing bioink was prepared from the above-mentioned nHA suspension (see 2.2.1). As-synthesized nHA was left overnight at 4°C in order to allow the sedimentation of the nanoparticles. An appropriate volume of supernatant was then removed to obtain a given concentration (e.g. 10% w/v nHA solution).N-HA Printing Conditions by LAB

In this study, according to previous experiments on LAB [21], the printing conditions have been the followings: a 5 kHz laser repetition rate, 6 to 12 µJ energy per pulse and a 40µm spot size.

Regarding ribbon preparation, the quartz slide was coated with an absorbing thin layer of titanium (60 nm) due to the transparency of the printing solution to near Infrared radiations. 25 µl of the printing solution was spread on the slide with a “doctor blade” device (Film Applicator 3570, Elcometer, France) to obtain a 20 to 30 µm-thick regular layer (Figure 1). Space between ribbon and substrate was set to 400 µm in agreement with previous droplet ejection observations performed using time resolved imaging [23]. Nano-hydroxyapatite printing experiments have been then realized onto quartz substrate according to different patterns: micro-arrays of small droplets [21], full squares or concentric rings for cell culture. Squares made by stacking 6 layers of nHA have been also printed for tridimensional and “bi-color” experiments (see § 3.4).

2.2.4 Physico-chemical and morphological characterization of the printed material

Physico-chemical characterization of printed materials has been performed using FTIR and XRD (see above). Morphological characterization has been achieved by optical microscopy (NIKON

Eclipse 80i, USA), SEM (see above) and optical profilometry (Wyko NT100, Veeco®, Tucson, USA). The mean droplet diameter has been determined for increasing laser energy (from 6 to 12 µJ) by means of image analysis of droplet arrays [21] using Image J® software (NIH: http://rsb.info.nih.gov/ij).

2.2.5 Biological Characterization of nHA printed

The quartz substrates were sterilized at 120°C for 12 hours and then coated with a sterile 2% agarose (Eurobio, France) solution prior to print nHA droplets patterns. MG63 cells (ATCC® Number: CRL-1427®) have been then seeded onto the nHA patterns (dots matrices and circles) at 50000 cells/cm² density in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, from Gibco, InVitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), supplemented with 10% FBS (Fetal Bovin Serum, Gibco) and antibiotics 1/1000 (v/v) (Pen Strep Gibco, Invitrogen, USA) for 1 to 6 days. Cell viability onto printed nHA patterns has been assessed by Live/Dead assay (L3224 Live/Dead, Gentaur, France) and their morphology was observed under a photomicroscope (Nikon eclipse 80i, The Netherlands). Then, SEM observations have been performed after cell fixation with 4% formalin and dehydration in graded ethanol and Hexamethyldisilazane (ACROS Organics, USA).

2.3 Laser assisted bioprinting of Human Osteoprogenitors (HOPs)

2.3.1 HOP isolation

HOPs have been isolated from human bone marrow stromal cells (HBMSC), according to Vilamitjana-Amédée et al. [24], with some modifications [25]. Briefly, human bone marrow was obtained by aspiration from the iliac crest of healthy donors (aged 20-50 years) undergoing hip prosthesis surgery. Cells were pooled and separated into a single suspension by sequentially passing the suspension through syringes fitted with 16, 18 or 21 gauge needles. After centrifugation for 15 min at 800g, the pellet was resuspended in Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM, from Gibco, InVitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) supplemented with 10 % (v/v) FBS and 10^{-8} M dexamethasone (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). Cells were cultured at density of $5x10^5$ cells/cm^2,

and incubated in a humidified atmosphere of 5 % CO_2 at 37 ºC. Four days later, medium was removed, replaced with complete medium supplemented with 10^{-8} M dexamethasone, and then every 4 or 5 days with IMDM containing 10 % FBS (v/v).

2.3.2 Preparation and printing conditions of the HOP bioink

Following trypsinization and cell pellet recovery, HOP cells have been resuspended in a 0,5 % Alginate (w/v) (FMC Biopolymer, Protanal 10/60, Norway) solution, in order to obtain a concentration of 50 million cells/ml. A thin layer of this cell ink (20 to 30 µm-thick) has been spread onto quartz donor ribbon using a "doctor blade" (Film Applicator 3570, Elcometer, France) while the quartz receiving substrate was coated with a thin layer of Matrigel© (100 µm) (BD Biosciences, France) to minimize cell injuries during landing [26,27]. Space between ribbon and substrate has been also adjusted to 400 µm. HOP LAB experiments have been performed with a 10 µJ pulse energy and a 40 µm diameter spot size, according to previous studies on cell printing [21]. Rectangular arrays of cell clusters have been obtained by scanning a 10 mm^2 area at 400 mm/s scanning speed and 1 kHz laser frequency.

2.3.3 Characterization of printed HOP

Post-printing cell observations have been carried out using an optical microscope (see above) after staining cell nucleus with Hoechst dye (Sigma-Aldrich, France). Cell viability of printed HOPs has been analyzed using Live/Dead assay kit (Molecular Probes, Invitrogen, France) from day 2 to day 15 after LAB printing. Conservation of mineralization capacity of HOPs has been first observed through alkaline phophatase (ALP) staining (ALP, Sigma Aldrich France) up to day 15 after cell printing. Osteocalcine content of printed HOPs was evaluated at day 7 and day 15 through immuno-chemical staining using Histostain®SP Invitrogen® LAB-SA Detection Kit according to manufacturer's instructions. Briefly, samples were fixed with methanol (10 minutes, 4°C) and rinsed three times with PBS. Then, printed cells were incubated one hour at 37°C with 5% Bovin Serum Albumin (Eurobio, USA) for non-specific sites saturation and washed with PBS. Printed cells and

positive control samples (cells seeded on culture plastic) were then incubated for 2 hours with 1:100 diluted anti-OCN monoclonal antibody (OCG2 Takara Bioinc®). After washing three times with PBS for 5 minutes, the samples were incubated with secondary antibody loaded with biotin for 10 minutes and rinsed with PBS three times. Finally, samples were incubated with conjugate enzyme and AEC chromogen for 5 minutes to reveal the reaction, and finally samples were rinsed with distilled water before observation under photomicroscope (see above).

2.4 Laser assisted bioprinting of multiple components

More complex structures have been also built by printing nHA and HOPs sequentially. In this aim, 6 layers (1.5 mm^2 each) of nHA were printed one to another, and then a ring of HOP cells (1 mm diameter, 120 µm band width) was printed onto the nHA square pattern (Figure 6a). Both pattern centers have been superimposed thanks to the computer driven positioning system integrated to the bioprinting workstation. Experimental printing conditions have been similar to those determined for monocolor printing of nHA and HOPs [see 2.2.4 and 2.3.2, respectively], except that the receiving substrate was not covered by a Matrigel© layer. Cell-material constructs have been maturated up to 6 days in IMDM medium containing 10% FBS (v/v). Follow-up has included cell position tracking, cell viability assays and ALP staining (see above) as well as morphological observations by SEM.

3 Results

3.1 Nano-Hydroxyapatite (nHA) characterization

The physico-chemical properties of nHA have been first characterized after synthesis. Transmission electron microscopy analysis of the dried synthesized material reveals 50 nm long needle-shaped crystals [21,28]. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis showed specific bands of phosphate ions at 960 cm^{-1} ($v2PO_4^{3-}$) and 1020 cm^{-1} ($v3PO_4^{3-}$) and traces of carbonates are also observed at 1415 cm^{-1} ($v3CO_3^{2-}$) and 865 cm^{-1} ($v2CO_3^{2-}$) (Figure 2a). X-Ray Diffraction (XRD) and Electron Dispersive Spectroscopy (EDS) analysis of the as-synthesized and dried material showed respectively crystals with hexagonal lattice parameters (a = 9,422 Å; c = 6,877 Å) and a Ca/P ratio 1.67, which are characteristic from stoichiometric hydroxyapatite [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] (Figure 2b).

3.2 Two-dimensional printing of nHA

3.2.1 Morphological and physico-chemical characterization of nHA droplets

Morphological characterization of laser-generated nHA droplets has been performed by optical microscopy and Scanning Electron Microscopy onto micro-arrays of droplets. As shown on previously published data [21], droplet diameter increased from 56 to 92 µm when laser pulse energy increased from 6µJ to 12 µJ (Figure 3). Additional SEM and optical profilometry observations revealed a rough surface over the whole surface of the printed material ([21] and data not shown).

Regarding physico-chemical characterization, FTIR spectroscopy analysis revealed that phosphate and carbonate bands previously observed were still present after printing, while an additional band corresponding to carbonate band appeared at 1530 cm^{-1} (Figure 2a). This later could be related to a complexion of hydroxyapatite with ambient carbon dioxide during or after printing [29]. Moreover, XRD performed on printed material revealed a slight modification of lattice parameters (a = 9.420 Å; c = 6.867 Å), which is coherent with carbonate substitution of nHA observed by FTIR

(the four sharp peaks observed on Figure 2b, top curve, are from aluminum sample holder).

3.2.2 Biocompatibility and guidance properties of nHA patterns

Biocompatibility and guidance properties of nHA patterns have been evaluated by observing MG63 osteoblastic cell viability and cell fate onto nHA patterns up to 6 days after seeding. Cell viability was first confirmed by Live/Dead assay (Figure 4a). Moreover, for the longest times of culture, MG63 cells attached, spread and aligned onto large nHA patterns (see Figure 4b). On the opposite, MG63 cells tended to form aggregates onto nHA droplets, with an increasing aggregate size with time (Figure 4c).

3.3 Human Osteo-progenitors printing

As presented above, microarrays of HOPs have been printed onto a Matrigel© film, then cell viability and phenotype conservation have been assessed up to 15 days in standard cell culture conditions. As shown in Figure 5a-b, printed droplet exhibited an average diameter of 180 µm and contained around 50 cells. Two days after printing, cells had spread within the Matrigel© film (Figure 5c). The initial cell pattern vanished over time. After 15 days, the entire substrate surface was entirely covered by living HOPs Figure 5d).

As shown in Figure 5c-e, Live Dead assay on printed HOPs was positive from day 2 to day 15 and ALP activity was present after 15 days.

Expression of osteocalcin was observed in printed HOPs through immunochemistry analyzes from day 7 to day 15 (Figure 5f). The result was similar to osteocalcin expression in positive control cells cultured on plastic dishes (data not shown).

3.4 Tridimensional printing of nHA and HOPs

Printing 3D complex assembly using LAB has been carried out by stacking a HOP cell ring (1 mm diameter, 120 µm band width) onto a homogeneous square made of 6 nHA layers (Figure 6). The printing conditions allowed maintaining cell viability and proliferation ability. After 3 days in culture medium, the initial cell pattern was slightly modified (Figure 6c) while on day 6, nHA

pattern appeared fully covered by cells (Figure 6d). HOP cell nucleus staining combined with fluorescence microscopy indicated that HOPs proliferated and migrated from their initial position (see Figures 6c,d) to cover the pattern of nHA. These results were confirmed by SEM observations (Figure 6e,f) showing cell spreading and filopodia formation onto nHA at day 3 and 6. Moreover, besides their adhesion and proliferation activity, printed HOPs maintained their osteoblastic phenotype (Positive ALP staining, Data not shown).

4 Discussion

We have used the LAB to fabricate a structure made of nHA and osteoblastic cells: First, we have shown that the printed nHA and cells were not altered by LAB and second, we have combined nHA and cells with microscale control, according to a bottom-up approach for bone tissue engineering.

4.1 General requirements for bioprinting biologically relevant components

Regarding living cell manipulation, bioprinting requires, i) the integration of high tech bio-printers and, ii) specific bioinks which composition and rheological properties are safe *vs* cell fate and suitable for high-resolution printing.

Consequently, we have developed the LAB with the aim to automatizing 2D and 3D assembly of a large panel of biologically relevant components *in vitro* but also *in vivo* [10,21]. In the current study, various patterns (droplet microarrays, circles, squares) of nHA and HOPs have been printed through an on-demand procedure by adjusting blueprint features to laser printing conditions (i.e. scanning speed, laser pulse rate and laser energy). For instance, droplets spaced apart from 150 µm were obtained using 750 mm/s scanning speed (and 5 kHz pulse rate and 6 to 12 µJ pulse energy) while a full square of nHA was obtained by processing at a lower writing speed (150 mm/s). Regarding living cell manipulation as well as future applications in tissue engineering, high throughput conditions must be achieved in order to reduce the bioprinting process duration as much as possible. In this purpose, we have worked with a minimal droplet ejection rate of 5 kHz.

The second main requirement is to prepare bioinks made of cells and biomaterials adapted to LAB applications. More specifically, the bioink may be an hydrogel solution, a suspension of cells, biomaterials in solution (synthetic biocompatible materials, natural extra-cellular matrices, cells, genes and proteins/peptides) or a combination of both. While the biocompatibilty of the bioink is required, additional features could be also desired. For instance, reticulation or gelation capacity could be looked for in the purpose of printing 3D structures [30,31]. Bioink specifications concern rheological parameters (surface tension, viscosity), whereas suspension characteristics encompass

liquid medium properties, particle size and surface features. Moreover particles must be homogeneously distributed within the liquid medium, and their size must be tailored to the desired final printing resolution. Jetting conditions are related to physical experimental conditions [15]. In this paper, we have used experimental parameters, which support cell viability.

4.2 Nanohydroxyapatite printing

Conventional hydroxyapatite materials for bone repair applications [32] do not meet the above-mentioned requirements for bioprinting. We have synthesized biocompatible nHA slurry according to a published protocol [22] with some modifications. Fifty nanometers long needle-shaped nHA crystals have been obtained by wet precipitation at low temperature, thus allowing to increase specific surface area and biocompatibility of this material [33].We have evaluated the printing resolution and the biological behavior of printed materials with regard to laser parameters.

N-HA bioink has been printed using different laser energies (6 to 12 µJ). Whatever the laser pulse energy necessary for printing nHA from the ribbon to the substrate, we have shown that physico-chemical and crystallographic properties of the material were weakly modified during the overall printing experiment. Indeed, as observed by FTIR, additional carbonate groups just arise after printing. This can be correlated to the nHA XRD spectrum (Figure 2b) that displays a slight modification of lattice parameters due to carbonate substitution. Such carbonate substitution in the apatite crystal lattice can occur in either the hydroxyl or the phosphate sites by reaction with ambient carbon dioxide [29].

Regarding printing morphology figure 3 showed that increasing laser energy results in larger droplet diameters. For higher energies (E = 20µJ, results not shown), irregular droplets featuring splashing and small satellites have been previously observed [21]. This may be related to the corresponding high kinetic energy of the droplets, what provokes their strong deformation that overcomes surface tension during landing onto the substrate.

Previous studies had focused on printing apatite materials and other ceramics using MAPLE-DW [34,35] or ink jet printing [36,37]. Hydroxyapatite printing by MAPLE-DW has been performed by

focusing a UV laser beam onto a quartz substrate, what led to patterns of 500 µm to 1 mm wide [34]. The low resolution reached in these experiments could be related to the average particle size of the hydroxyapatite powder (500 nm) and to high bioink film thickness (250µm), as compared to the nanometer size particles (50 nm) and to the 20-30 µm film thickness experimented in the present study. Moreover, the micro scale resolution achieved in the current work could be also related to the low viscosity of nHA suspension, which allows spreading thin layers (20-30 µm) onto the ribbon. Hence, lower pulse energy has been necessary for ejecting nHA droplets, thus resulting in smaller droplets and enhanced resolution.

Finally, the biocompatibility of the printed material has been demonstrated using MG63 cell culture onto nHA patterns, leading to cell proliferation and formation of cell aggregates onto printed nHA droplets (Figure 4c). These experiments illustrate the advantage given by printing a solution containing any solvents or toxic reagents as compared to previous studies on inkjet printing of HA slurry including organic solvents [36]. This also demonstrates that LAB does not alter material biocompatibility.

4.3 HOP cell fate after bioprinting

HOPs have been printed onto a substrate made of Matrigel© according to a micro-array of droplets (Figure 5a). The relatively wide diameter of printed droplets (around 180 µm) can be explained by the wettability of the Matrigel© film substrate which induced droplet spreading. Conservation of cell viability and cell phenotype (observed measuring alcaline phosphatase activity and osteocalcin expression) was evidenced up to day 15 in standard cell culture conditions, suggesting that LAB has no deleterious effects on HOPs viability and osteoblastic phenotype (Figure 5d-f). Cell proliferation capacity was also shown through the complete covering of the surface of the pattern of nHA by printed HOPs after 15 days in culture.

Moreover, as shown on Figure 6, the fate of nHA-HOP structures illustrates that cells survive the printing process onto nHA, and maintained their adhesion, spreading, proliferation and differentiation capacities. Previous studies on cell fate after printing have shown that cell damages

can be related to landing conditions [15]. In this study, nHA seems to act as a shock-absorbing mattress. In addition, nHA layers seem to “block” and retain cells inside the material during the first hours before attachment onto the material, like other materials such as hydrogels.

4.4 Cell patterning and tissue microfabrication by Laser-Assisted Bioprinting

We have demonstrated that the LAB can pattern cells at the micron scale and could be a procedure usefull in cell patterning and tissue microfabrication. Cell patterning [38] can be achieved either directly by printing cells, or indirectly by patterning a surface with proadhesive components. Regarding the indirect procedure (Figures 4a-b), MG63 cells could be patterned through nHA patterns. Similar approaches have been developed by depositing by laser RGD peptides onto PET surfaces [39]. In the other hand, laser parameters should be adapted depending on the desired cell pattern to print. If the droplet diameter is large enough, two contiguous printed droplets may coalesce, resulting in a continuous alignment of cells [40]. As a consequence, the higher the energy deposited, the wider the printed cell line becomes.

Since biological tissues are composed of multiple components in close interactions with each other (Different cell types, extracellular matrix ...), not only 3 dimensional structures but also multiple “colors” of biological materials should be considered in a tissue engineering product. We have presented the first experimental demonstration of multicolor printing performed by LAB. This study differs from previous data in which a mixture of coarse hydroxyapatite particles and MG63 cells were suspended into the bioink [34]. Using analog procedures, future work will address more complex 3D structures. For instance, these latter would concern successive printing of nano-hydroxyapatite, human osteoblasts or human mesenchymal stem cells, extracellular matrix components and relevant growth factors, in a defined spatial organization and in a tri-dimensional structure. This would allow to evaluate whether one defined organization of each element brings an advantage in terms of tissue ingrowth and functionality over one randomized layout of the same elements. In addition, such microfabricated assembly should be a relevant method for promoting and studying cell interactions and cross talks, in a highly controlled manner [41].

Finally, we have demonstrated that nHA could be patterned with human cells in 2D and 3D using LAB. Biopapers, which may be composed, of natural materials like collagen and fibrin could be used as substrate to improve the cohesion, and to bring biological cues (like growth factors [42]) and structural properties to the overall structure.

5 Conclusion

We have demonstrated that LAB is a relevant method for cell patterning and biofabrication of 2D and 3D constructs. We have adjusted experimental conditions for creating on-demand patterns of inorganic (50 nm long needle shape nanohydroxyapatite crystals) and living components (human osteoprogenitor cells) involved in bone tissue engineering. In addition, we have provided evidence that nHA and cells keep their functionality after printing. Indeed, while physico-chemical properties of nanohydroxyapatite are not altered by the printing process, cell adhesion, spreading, proliferation and differentiation capacity over time was demonstrated by SEM, fluorescence microscopy and immunochemistry analyzes. This demonstration of LAB innocuousness paves the way of important prospects in the field of biofabrication for regenerative medicine and *in vitro* testing/diagnostics.

Acknowledgments

We would like to thank the Aquitaine Region, GIS Advanced Materials in Aquitaine and the French Institute for Dental Research (IFRO) for financial support. Transmission Electron Microscopy observations were carried out at SERCOMI, Bordeaux 2 University.

References

1. Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. Trends Biotechnol 2009 Oct; 27:562-571.
2. Nelson CM, Tien J. Microstructured extracellular matrices in tissue engineering and development. Curr Opin Biotechnol 2006 Oct; 17:518-523.
3. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science 2009; 324:1673.
4. Rivron NC, Rouwkema J, Truckenmüller R, Karperien M, De Boer J, Van Blitterswijk CA. Tissue assembly and organization: Developmental mechanisms in microfabricated tissues. Biomaterials 2009 Oct; 30:4851-4858.
5. Chan BP, Chan OCM, So K. Effects of photochemical crosslinking on the microstructure of collagen and a feasibility study on controlled protein release. Acta Biomater 2008 Nov; 4:1627-1636.
6. Ingber DE. Mechanical control of tissue growth: Function follows form. PNAS 2005; 102:11571-11572.
7. Engler AJ, Humbert PO, Wehrle-Haller B, Weaver VM. Multiscale Modeling of Form and Function. Science 2009; 324:208-212.
8. Nelson CM. Geometric control of tissue morphogenesis. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res 2009; 1793:903-910.
9. Peerani R et al. Niche-mediated control of human embryonic stem cell self-renewal and differentiation. EMBO J 2007; 26:4744.
10. Keriquel V et al. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. Biofabrication 2010; 2:014101.

11. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends Biotechnol 2003; 21:157-161.

12. Boland T, Xu T, Damon B, Cui X. Application of inkjet printing to tissue engineering. Biotechnol J 2006; 1:910-7.

13. Nakamura M et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. Tissue Eng 2005; 11:1658-1666.

14. Jakab K et al. Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. Tissue Eng Part A 2008; 14:413-21.

15. Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. Nanomed 2010; 5:507-515.

16. Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. Biomed Microdev 2004; 6:139-147.

17. Hopp B et al. Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. Tissue Engineering 2005; 11:1817-23.

18. Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB. Application of laser printing to mammalian cells. Thin Solid Films 2004; 453-454:383-387.

19. Colina M, Serra P, Fernández-Pradas J, Sevilla L, Morenza J. DNA deposition through laser induced forward transfer. Biosens Bioelec 2005; 20:1638-1642.

20. Duocastella M, Colina M, Fernández-Pradas J, Serra P, Morenza J. Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. Appl Surf Sci 2007; 253:7855-7859.

21. Guillemot F et al. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. Acta Biomat 2010; 6:2494-2500.

22. Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri MR, Sorrell CC. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. Mater Design 2003; 24:197-202.

23. Duocastella M, Fernandez-Paras J, Serra P, Morenza J. Jet Formation in the laser forward transfer of liquids. Appl Phys A 2008; 93:453-456.

24. Vilamitjana-Amédée J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand M. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. In vitro Cell Dev Biol 1993; 29:699-707.

25. Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. Am J Physiol Cell Physiol 2002; 282:C775-785.

26. Ringeisen BR et al. Laser Printing of Pluripotent Embryonal Carcinoma Cells. Tissue Eng 2004; 10:483-491.

27. Wang W, Huang Y, Grujicic M, Chrisey DB. Study of Impact-Induced Mechanical Effects in Cell Direct Writing Using Smooth Particle Hydrodynamic Method. J Manuf Sci Eng 2008; 130:021012-10.

28. Catros S et al. Physico-chemical and biological properties of nano-hydroxyapatite synthesized at room temperature. IRBM 2010; in press.

29. Barralet J, Best S, Bonfield W. Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: An investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. J Biomed Mater Res 1998; 41:79-86.

30. Nakamura M et al. Ink Jet Three-Dimensional Digital Fabrication for Biological Tissue Manufacturing: Analysis of Alginate Microgel Beads Produced by Ink Jet Droplets for Three Dimensional Tissue Fabrication. J Imag Sci Technol 2008; 52:060201-6.

31. Cui X, Boland T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. Biomaterials. 2009; 30:6221-6227.

32. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 2000; 21:2529-2543.

33. Kasten P, Luginbühl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Bohner M, Bosch U. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, [beta]-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. Biomaterials 2003; 24:2593-2603.

34. Doraiswamy A, Narayan RJ, Harris ML, Qadri SB, Modi R, Chrisey DB. Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites. J Biomed Mater Res A 2007; 80:635-643.

35. Harris M, Doraiswamy A, Narayan R, Patz T, Chrisey D. Recent progress in CAD/CAM laser direct-writing of biomaterials. Mat Sci Eng 2008; 28:359-365.

36. Lejeune M, Chartier T, Dossou-Yovo C, Noguera R. Ink-jet printing of ceramic micro-pillar arrays. J Eur Ceram Soc 2009 Mar;29(5):905-911.

37. Noguera R, Lejeune M, Chartier T. 3D fine scale ceramic components formed by ink-jet prototyping process. J Eur Ceram Soc 2005; 25:2055-2059.

38. Chen C, Barron J, Ringeisen B. Cell patterning without chemical surface modification: Cell–cell interactions between printed bovine aortic endothelial cells (BAEC) on a homogeneous cell-adherent hydrogel. Appl Surf Sci 2006; 252:8641-8645.

39. Zouani O, Chollet C, Lesage S, Chanseau C, Guillemot F, Durrieu M. RGD Peptides Grafting onto Polyethylene Terephthalate Surfaces by Biological Laser Printing. 2nd Chinese-European Symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine. Barcelona, Spain:16-20 Nov 2009.

40. Guillotin B et al. Laser Assisted Bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. Biomaterials 2010; *in press*.

41. Albrecht DR, Underhill GH, Wassermann TB, Sah RL, Bhatia SN. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. Nat Meth 2006; 3:369-375.

42. Hall H. Modified Fibrin Hydrogel Matrices: Both, 3D-Scaffolds and Local and Controlled Release Systems to Stimulate Angiogenesis. Current Pharma Design 2007; 13:3597-3607

Figures Captions

Figure 1: Laser-Assisted Bioprinting (LAB) set-up

Figure 2: Physico-chemical and morphological characterization of nano-hydroxyapatite

Figure 2a: FTIR analysis of nHA before and after the printing process

Figure 2b: XRD analysis of nHA before (lower curve) and after printing (upper curve)

Figure 3: Two-dimensional nHA Droplet Diameter Distribution vs Laser Energy (Original images are in [21])

Figure 4: MG63 Osteoblastic Cell fate on nHA patterns

Figure 4a: MG63 cells seeded on nHA circular pattern (Live/Dead Assay) (Day 6)

Figure 4b: MG63 cells seeded on nHA circular pattern (Optical Microscopy, magnificated area of Figure 4a) (Day 6)

Figure 4c: SEM observations of MG63 cell spheroids (x170, left) and detail (x1300, right) (Day 6**)**

Figure 5: Human Osteo-Progenitors (HOPs) printing and cell fate until day 15

Figure 5a: Microarray of HOP droplets (HOPs nucleus stained by Hoechst dye, day 0)

Figure 5b: HOP cell droplets (zoomed area of Figure 5a, day 0)

Figure 5c: Live Dead assay (Microarray of HOPs printed on Matrigel, Day 2)

Figure 5d: Live Dead assay (Microarray of HOPs printed on Matrigel, Day 15)

Figure 5e: Alcaline Phosphatase staining (HOPs printed on Matrigel Day 15)

Figure 5f: Osteocalcin immuno-staining (HOPs printed on Matrigel, day 15)

Figure 6: Multiple colors printing by LAB

Figure 6a: Experimental design

Figure 6b: Optical microscopy of the initial pattern (Day 0)

Figure 6c: Fluorescence microscopy after Hoechst coloration showing cell migration and proliferation (Day 3)

Figure 6d: Fluorescence microscopy after Hoechst coloration of HOP cells, showing a complete covering of the initial nHA pattern (Day 6)

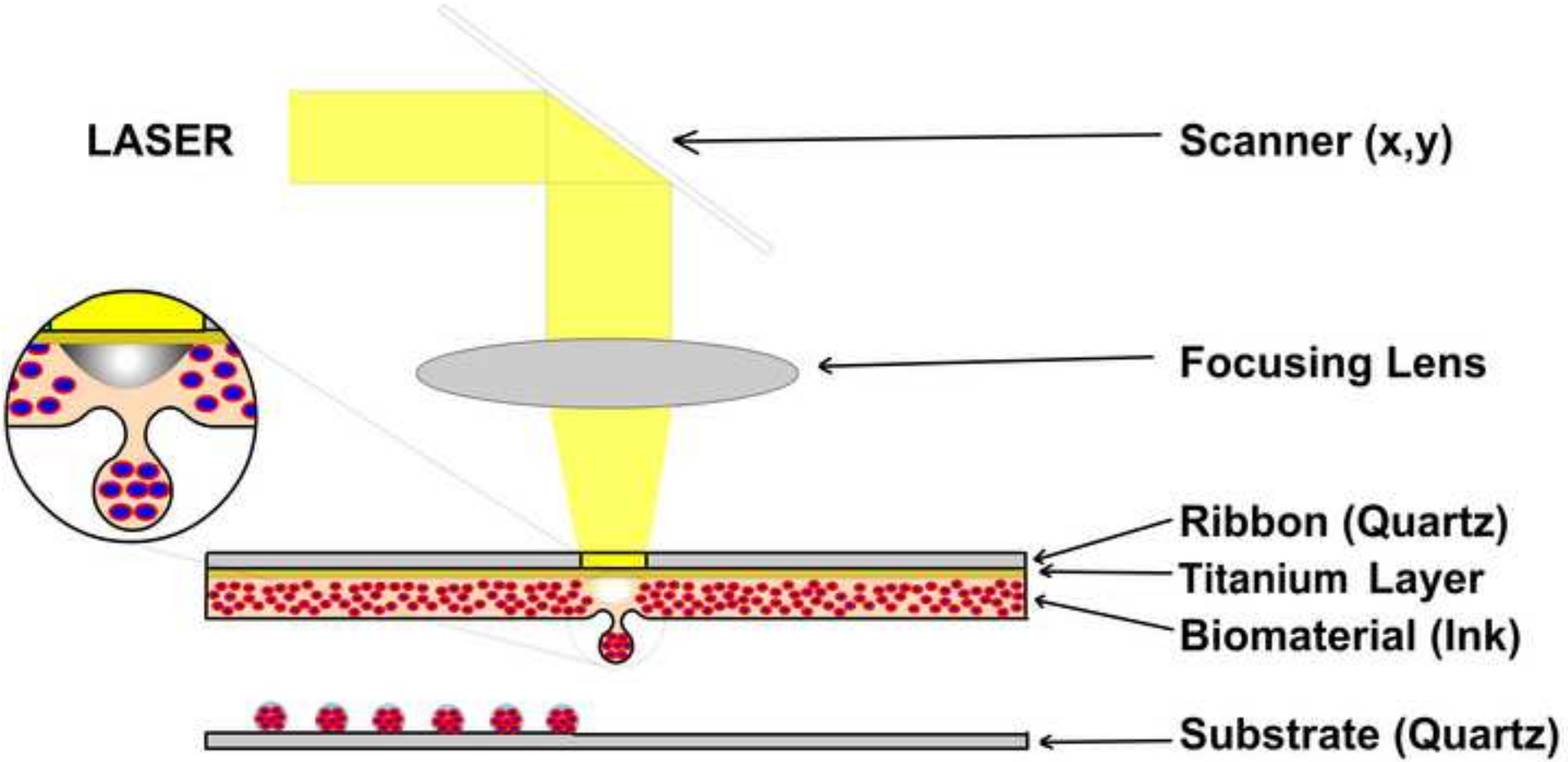
Figure 6e: Scanning Electron Microscopy of nHA surface. HOP cells spread onto the material (Day 3)

Figure 6f: Scanning Electron Microscopy of nHA surface. HOP cells spread onto the material (Day 6)

Figure 6g: ALP activity assay showing that HOPs maintain their osteoblastic phenotype (Day 6)

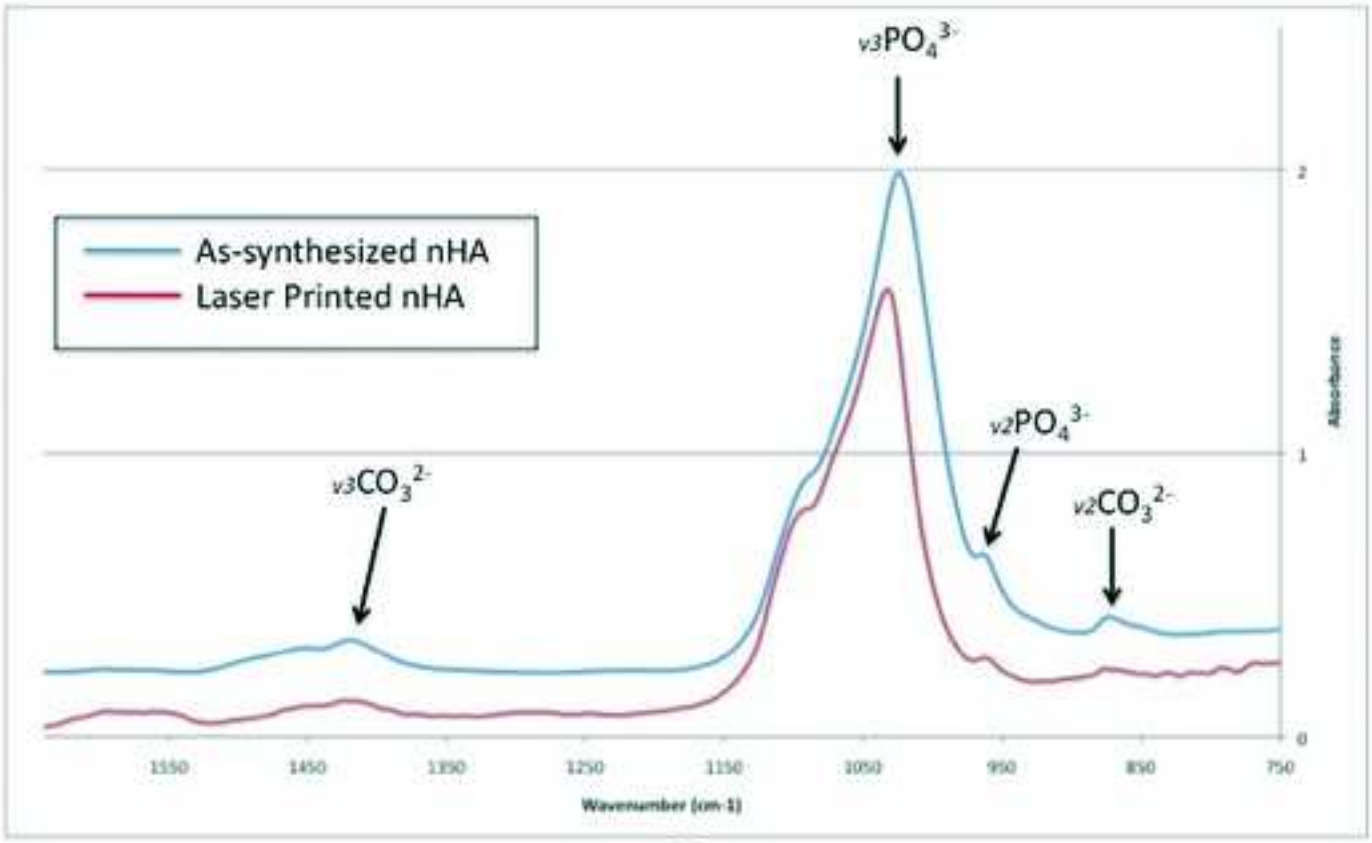
Figure(s)

Click here to download high resolution image

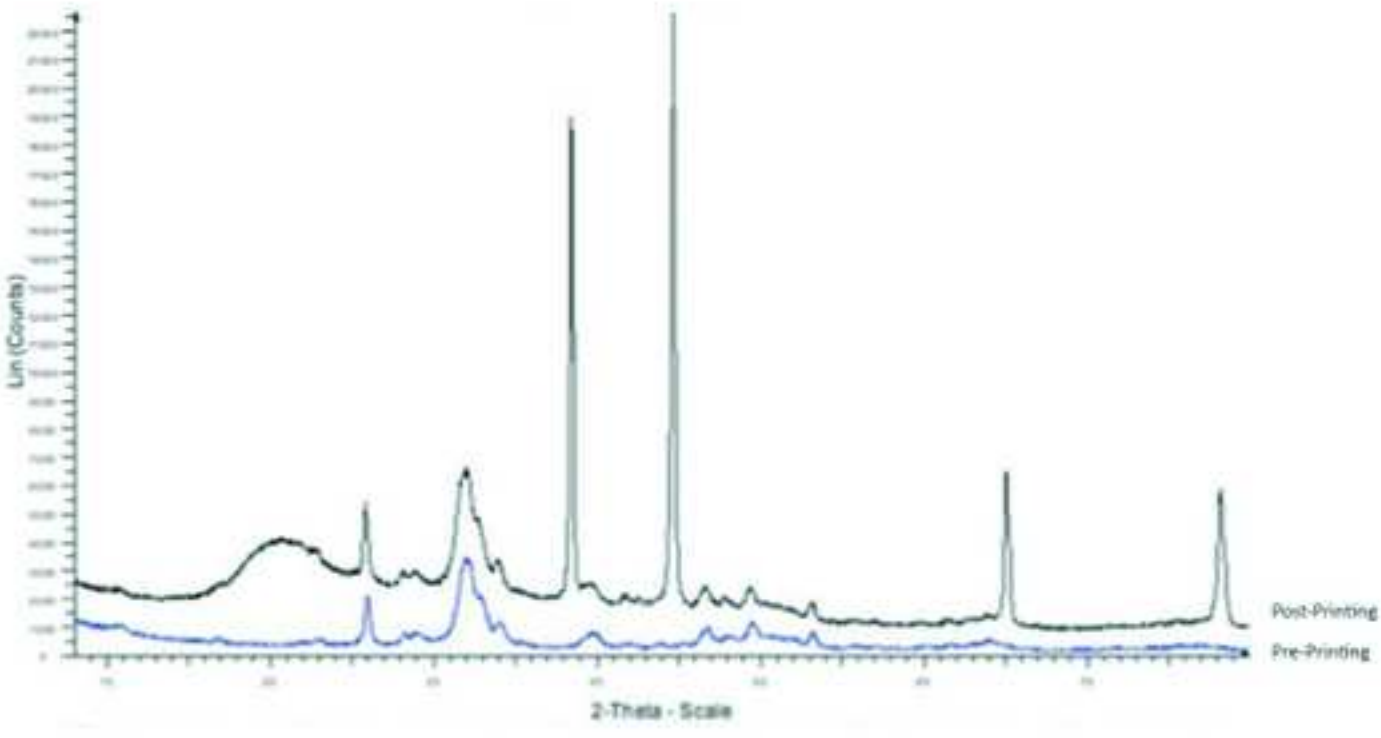


Figure(s)

Click here to download high resolution image



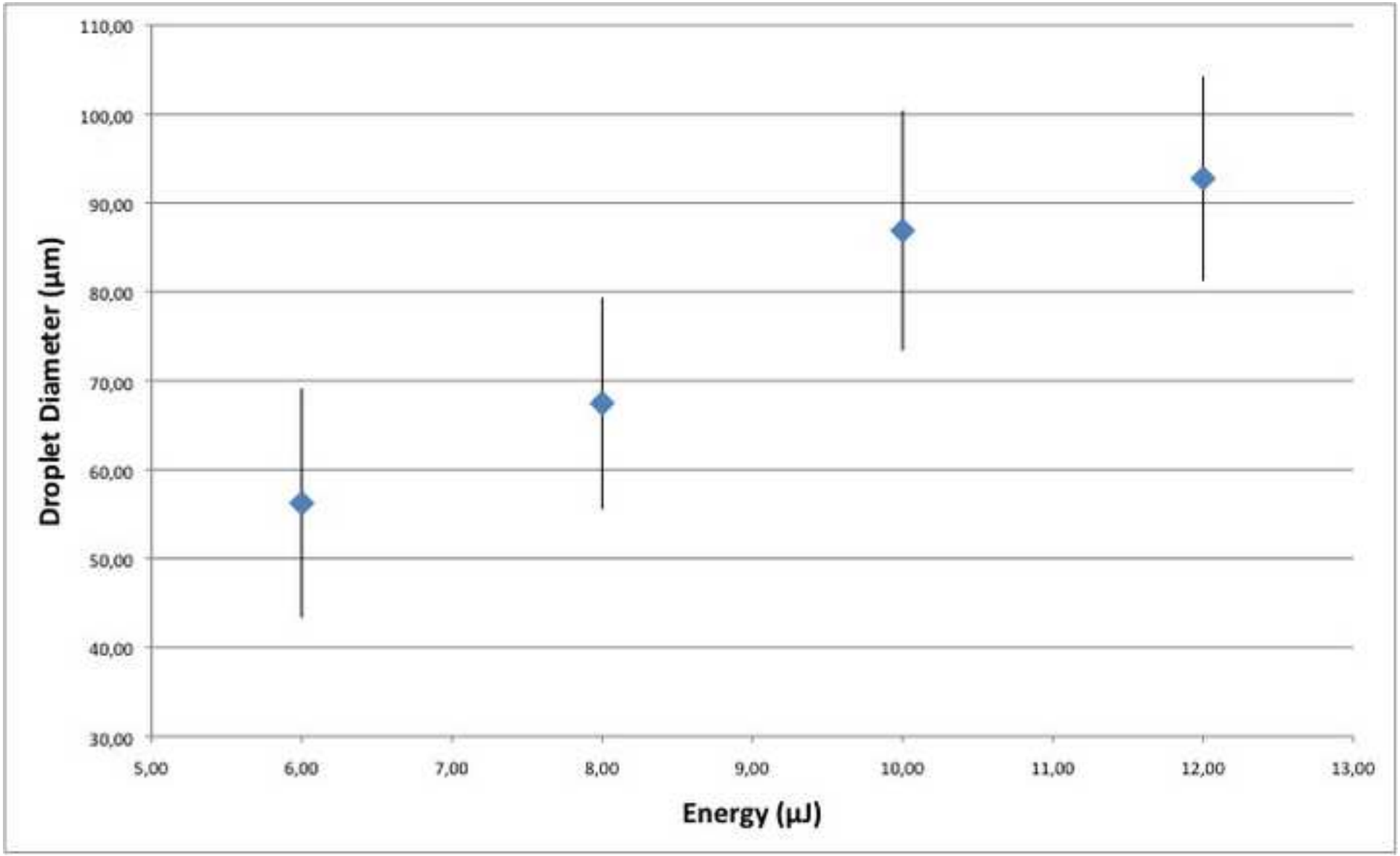
a



b

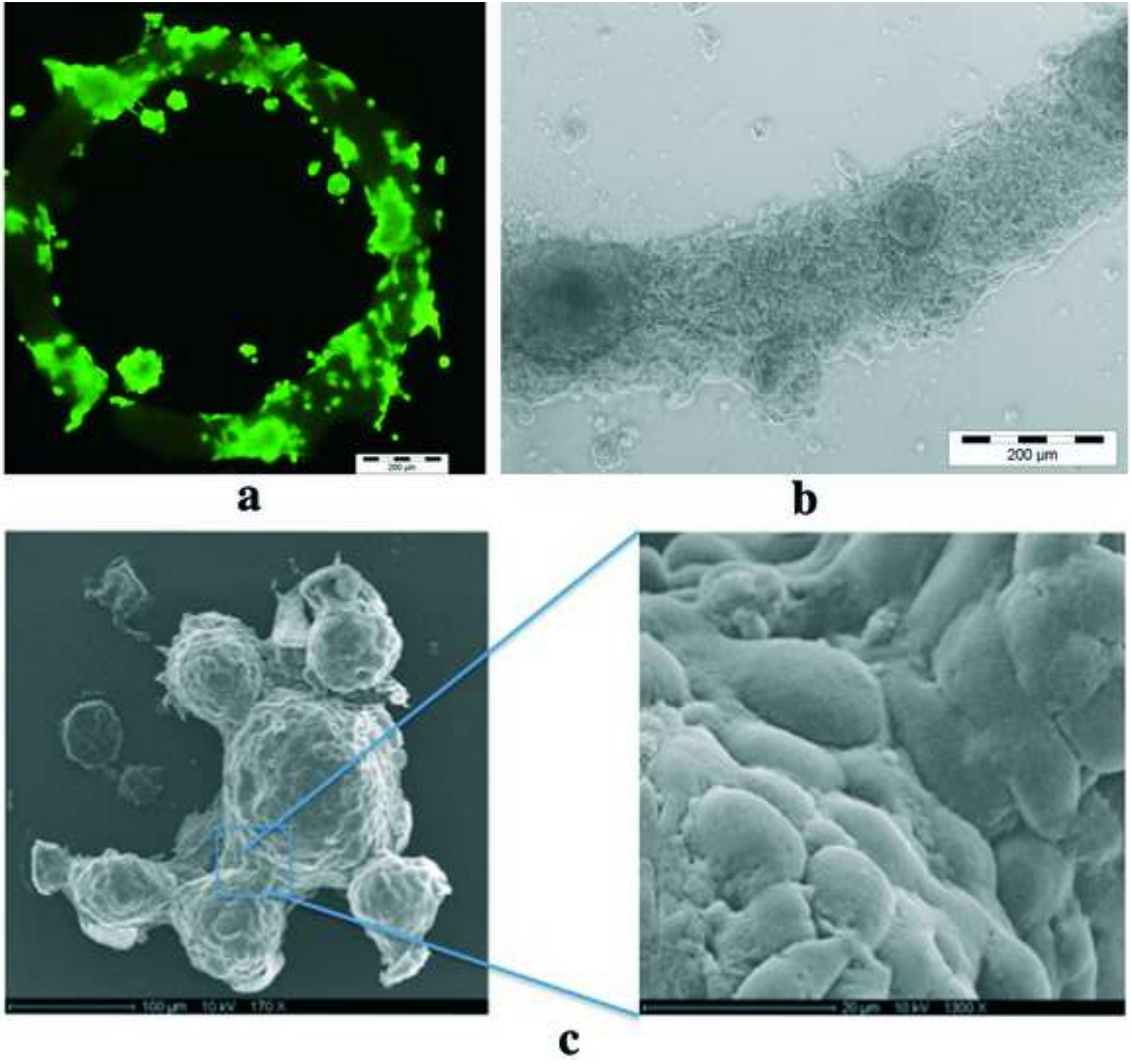
Figure(s)

Click here to download high resolution image



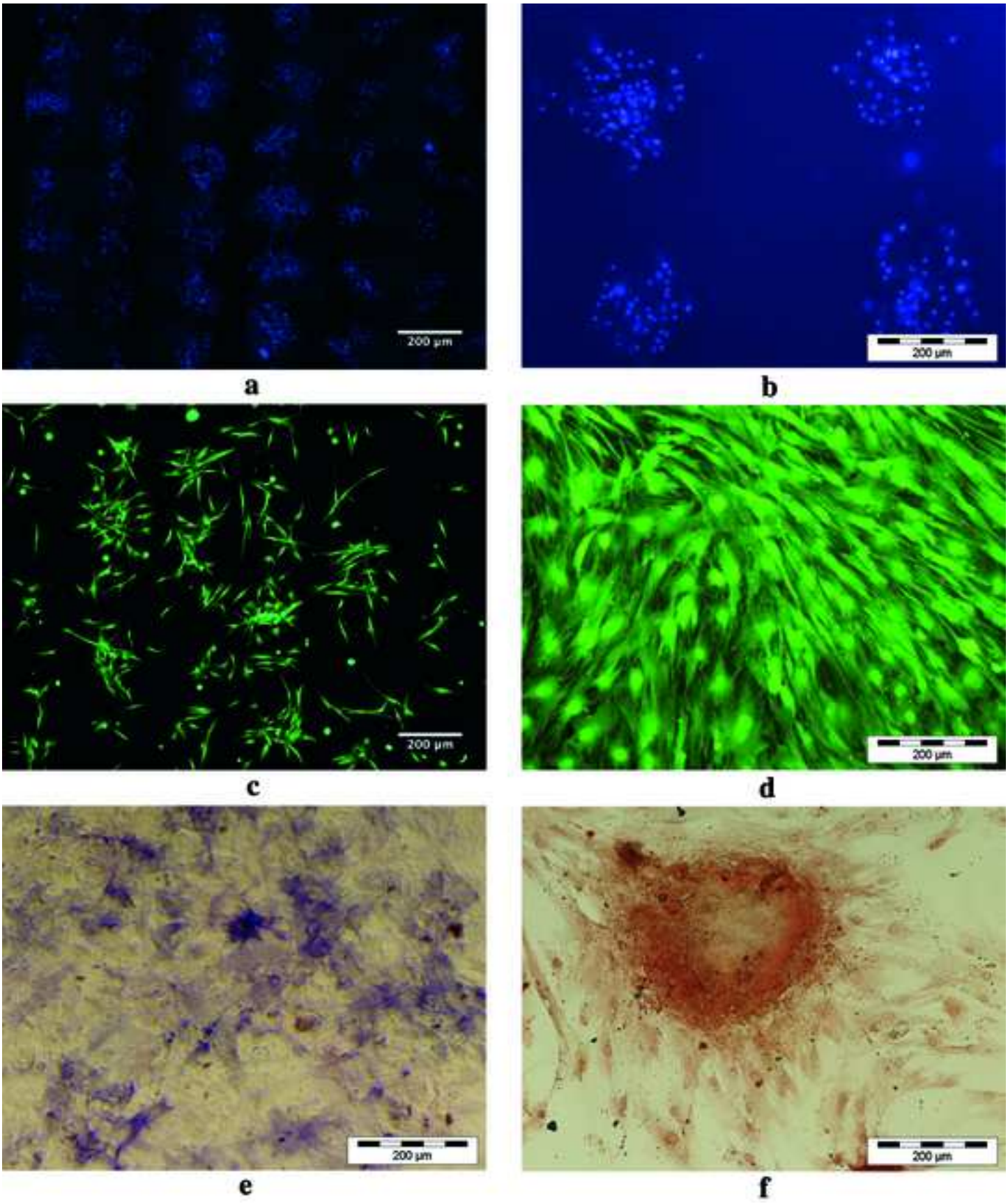
Figure(s)

Click here to download high resolution image



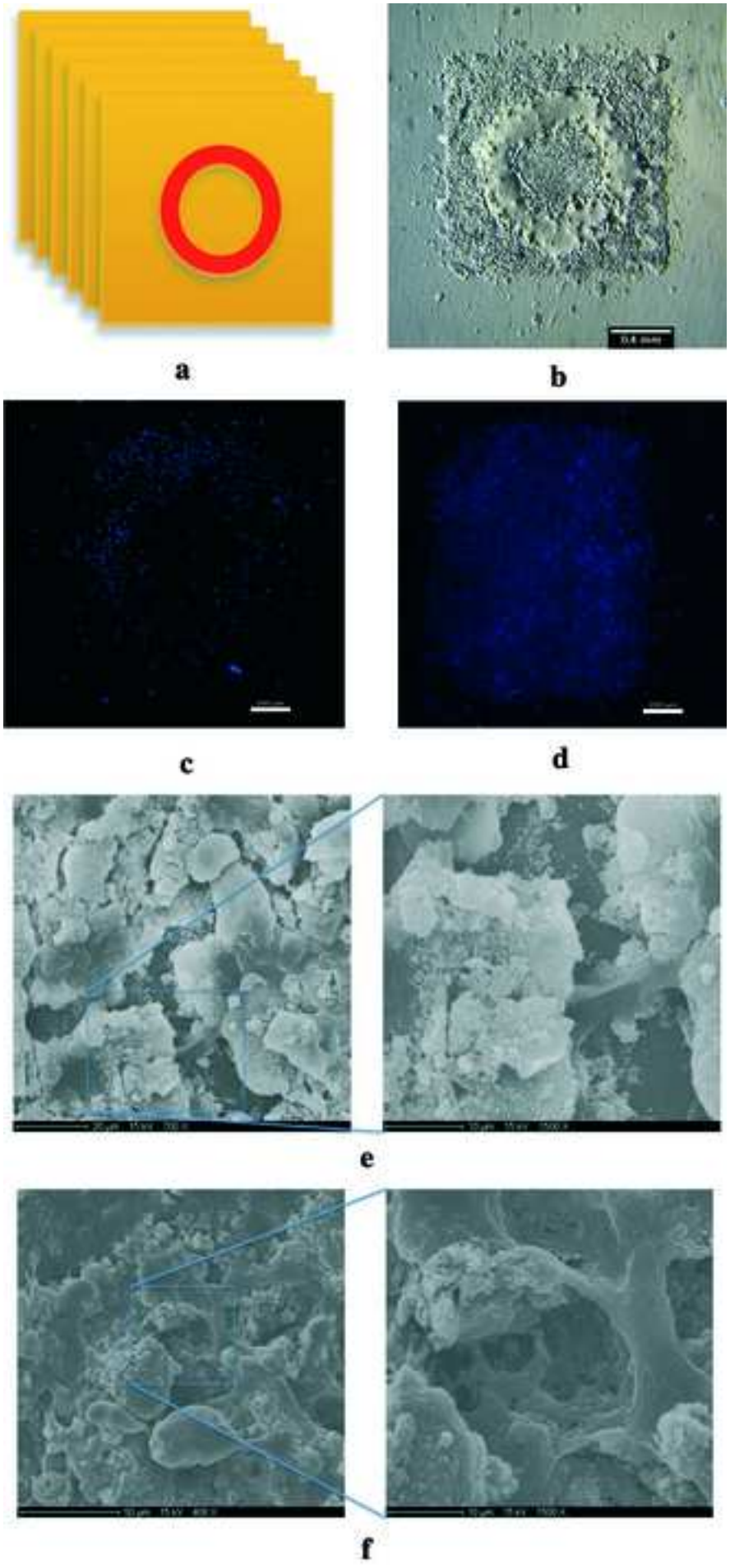
Figure(s)

Click here to download high resolution image



Figure(s)

Click here to download high resolution image



Metadata of the chapter that will be visualized online

ChapterTitle	High-Throughput Biological Laser Printing: Droplet Ejection Mechanism, Integration of a Dedicated Workstation, and Bioprinting of Cells and Biomaterials	
Chapter Sub-Title		
Chapter CopyRight - Year	Springer Science+Business Media B.V. 2010 (This will be the copyright line in the final PDF)	
Book Name	Cell and Organ Printing	
Corresponding Author	Family Name	**Guillemot**
	Particle	
	Given Name	**Fabien**
	Suffix	
	Division	
	Organization	INSERM, U577
	Address	Bordeaux, F-33076, France
	Email	fabien.guillemot@inserm.fr
Author	Family Name	**Guillotin**
	Particle	
	Given Name	**Bertrand**
	Suffix	
	Division	
	Organization	INSERM U577
	Address	Bordeaux, F-33076, France
	Email	bertrand.guillotin@inserm.fr
Author	Family Name	**Catros**
	Particle	
	Given Name	**Sylvain**
	Suffix	
	Division	
	Organization	INSERM U577
	Address	Bordeaux, F-33076, France
	Email	sylvain.catros@inserm.fr
Author	Family Name	**Souquet**
	Particle	
	Given Name	**Agnès**
	Suffix	
	Division	
	Organization	INSERM U577
	Address	Bordeaux, F-33076, France
	Email	agnes.souquet@inserm.fr
Author	Family Name	**Mezel**
	Particle	
	Given Name	**Candice**
	Suffix	
	Division	

	Organization	Centre Lasers Intenses et Applications, UMR 5107 CEA V CNRS – Université Bordeaux 1
	Address	33405, Cedex, France
	Email	mezel@celia.u-bordeaux1.fr

Author	Family Name	**Keriquel**
	Particle	
	Given Name	**Virginie**
	Suffix	
	Division	
	Organization	INSERM U577
	Address	Bordeaux, F-33076, France
	Email	u577@inserm.fr

Author	Family Name	**Hallo**
	Particle	
	Given Name	**Ludovic**
	Suffix	
	Division	
	Organization	Centre Lasers Intenses et Applications, UMR 5107 CEA V CNRS – Université Bordeaux 1
	Address	33405, Cedex, France
	Email	hallo@celia.u-bordeaux1.fr

Author	Family Name	**Fricain**
	Particle	
	Given Name	**Jean-Christophe**
	Suffix	
	Division	
	Organization	INSERM U577
	Address	Bordeaux, F-33076, France
	Email	jean-christophe.fricain@biophys.u-bordeaux2.fr

Author	Family Name	**Amedee**
	Particle	
	Given Name	**Joëlle**
	Suffix	
	Division	
	Organization	INSERM U577
	Address	Bordeaux, F-33076, France
	Email	joelle.amedee@inserm.fr

Abstract	High-Throughput Biological Laser Printing (HT BioLP) requires taking into account spatio-temporal proximity of laser pulses (that means pulse-to-pulse distance and laser pulse frequency). The droplet ejection mechanism is indeed governed by vapor bubble dynamics (bubble growth and collapsing) and it is thus related to both the condition of laser irradiation and the rheological properties of the liquid film (viscosity, surface tension). We present a rapid prototyping workstation which has been designed for HT BioLP applications. It is equipped with an infra-red pulsed laser (pulse duration = 30 ns, wavelength = 1,064 nm, f = 1–100 kHz), galvanometric mirrors (scanning speed up to 2,000 mm/s), micrometric translation stages (x, y, z) and a dedicated software. Then, after describing experimental conditions leading to the high resolution printing (including cell density, laser parameters, etc.) of biological components, we present some typical multi-component and 3D printings achieved using this workstation. Finally, considering different criteria (speed, inoquity, etc.) the potentiality of HT BioLP is discussed as an alternative technology in Tissue Engineering applications.

Chapter 6
High-Throughput Biological Laser Printing: Droplet Ejection Mechanism, Integration of a Dedicated Workstation, and Bioprinting of Cells and Biomaterials

Fabien Guillemot, Bertrand Guillotin, Sylvain Catros, Agnès Souquet, Candice Mezel, Virginie Keriquel, Ludovic Hallo, Jean-Christophe Fricain, and Joëlle Amedee

Abstract High-Throughput Biological Laser Printing (HT BioLP) requires taking into account spatio-temporal proximity of laser pulses (that means pulse-to-pulse distance and laser pulse frequency). The droplet ejection mechanism is indeed governed by vapor bubble dynamics (bubble growth and collapsing) and it is thus related to both the condition of laser irradiation and the rheological properties of the liquid film (viscosity, surface tension). We present a rapid prototyping workstation which has been designed for HT BioLP applications. It is equipped with an infra-red pulsed laser (pulse duration = 30 ns, wavelength = 1,064 nm, f = 1–100 kHz), galvanometric mirrors (scanning speed up to 2,000 mm/s), micrometric translation stages (x, y, z) and a dedicated software. Then, after describing experimental conditions leading to the high resolution printing (including cell density, laser parameters, etc.) of biological components, we present some typical multi-component and 3D printings achieved using this workstation. Finally, considering different criteria (speed, inoquity, etc.) the potentiality of HT BioLP is discussed as an alternative technology in Tissue Engineering applications.

6.1 Introduction

In parallel to scaffold-based approaches involving cell seeding of porous structures [1], some authors have suggested three-dimensional biological structures can be built from the bottom up by the technology of bioprinting: the automated, computer-aided printing of cells, cell aggregates and biomaterials [2–4]. Towards this end, commercially available ink-jet printers have been successfully redesigned [5] or new ones built [6, 7] to pattern biological assemblies according to a computer-aided

F. Guillemot (✉)
INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France; University of Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076 France
e-mail: fabien.guillemot@inserm.fr

B.R. Ringeisen et al. (eds.), *Cell and Organ Printing*,
DOI 10.1007/978-90-481-9145-1_6, © Springer Science+Business Media B.V. 2010

UNCORRECTED PROOF

design template. Pressure-operated mechanical extruders have been also developed to handle living cells and cell aggregates [3]. Parallel to these methods, laser-assisted printing technologies have emerged as alternative methods for the assembly and micropatterning of biomaterials and cells. Laser-guided direct writing (LGDW) is a technique capable of trapping multiple cells in a laser beam and deposit them as a steady stream on arbitrary non-absorbing surfaces [8, 9]. Biological laser printing is based on the laser-induced forward-transfer (LIFT) technique in which a pulsed laser is used to induce the transfer of material from a source film [10]. If the material is not embedded in a laser light-absorbing matrix, a thin sacrificial absorbing layer is necessary. Accordingly, processes have been called Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation – Direct Write (MAPLE-DW) [11] or Absorbing Film Assisted – LIFT (AFA-LIFT) [12], respectively. Since BioLP has proven more effective with the aid of the intermediate light-absorbing layer, MAPLE-DW has been abandoned. Thus, under suitable irradiation conditions, and for liquids presenting a wide range of rheologies, the material can be deposited in the form of well-defined circular droplets with a high degree of spatial resolution [13, 14].

6.2 Droplet Ejection Mechanism

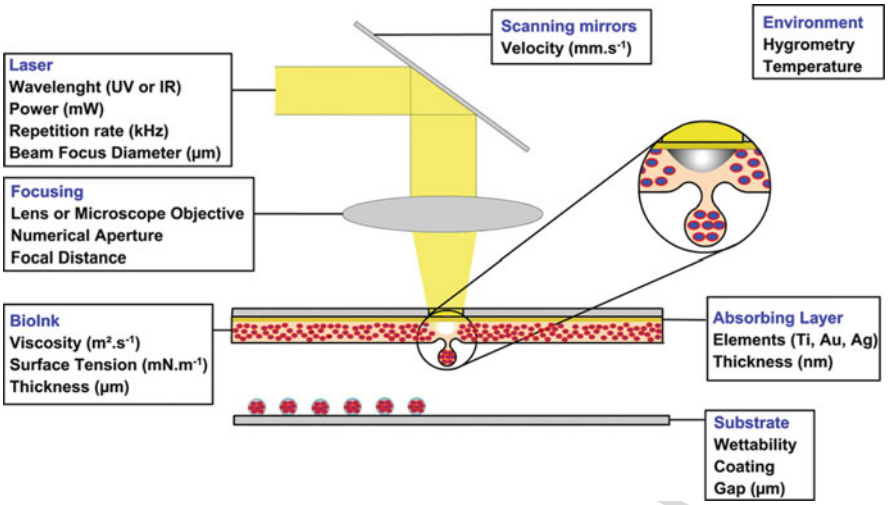
6.2.1 Principle

A typical LIFT experimental set up is generally composed of three elements: a pulsed laser source, a target coated with the material to be printed, and a receiving substrate (see Fig. 6.1). The target is a three layer component: a support, which is transparent to the laser radiation wavelength, coated with a thin absorbing layer, coated itself with a transfer layer, named bioink, that contains the elements to be printed (biomaterials, cells, biomolecules, etc.). As described elsewhere [10, 15, 16], the generation of microdroplets by LIFT proceeds through 6 consecutive steps:

(i) The laser energy is first deposited into the skin depth of the absorbing layer;
(ii) The absorbing layer is then heated in its skin depth;
(iii) inducing heating of a very thin film of the bioink near the absorbing layer;
(iv) a vapor bubble is generated depending on the laser irradiation intensity;
(v) the vapor bubble expands, and;
(vi) triggers the bioink – air interface deformation.

It has been shown that depending on the laser energy, three LIFT regimes could be isolated: the sub-threshold, the jetting and the plume regimes [10]. In addition, it was found that the volume of deposited material depends linearly on the laser pulse energy, and that a minimum threshold energy has to be overcome for droplet ejection to occur [15]. As described in Fig. 6.1, microdroplet ejection is dependent on multiple parameters. In this chapter, the main ones will be discussed with a view to high-throughput applications.

UNCORRECTED PROOF



This figure will be printed in b/w

Fig. 6.1 A typical LIFT experimental set up is generally composed of three elements: a pulsed laser source, a target coated with the material to be transferred, and a receiving substrate. The target is a three layers component: a support, transparent to the laser radiation wavelength, coated with a thin absorbing layer, coated itself with a transfer layer, named bioink, that contains the elements to be printed (biomaterials, cells, biomolecules,. . .)

6.2.2 The Absorbing Layer

To determine which metal to use for the absorbing layer and its thickness, the metal absorption coefficient and its skin depth have to be considered. The absorbing layer would be chosen to have a high absorption coefficient and a thickness slightly higher than the metal skin depth. The absorption coefficient A is defined by the Fresnel relations (Equation 1). The skin depth depends on the laser wavelength and the imaginary part of the complex refractive index of the metal (Equation 2):

$$A(\lambda) = 1 - R = \frac{4n}{(n+1)^2 + \kappa^2} \tag{1}$$

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi\kappa} \tag{2}$$

where R the reflection coefficient, n and κ the real and the imaginary part of the complex refractive index respectively, δ the skin depth and λ the laser wavelength. Table 6.1 presents titanium and gold optical characteristics at room temperature in the UV and IR range.

In the IR range, a titanium absorbing layer is a more efficient transducer layer than a gold absorbing layer because of its higher absorption coefficient (45% in titanium instead of 0.9% in gold). The titanium skin depth at 1,064 nm is 50 nm. In the UV range, a titanium or a gold coating can be used since the absorption coefficients are similar (55.7 and 65.5%, respectively).

UNCORRECTED

Table 6.1 Comparison of optical characteristics of titanium and gold at room temperature at 1,064 and 355 nm

	λ (nm)	n	□ k	δ (nm)	A (%)	R (%)
Titanium	1,064	3.35	3.30	50	45	55
	355	1.3	2.01	28	55.7	44.3
Gold	1,064	0.1	6.54	25	0.9	99.1
	355	0.58	1.73	32	65.5	34.5

6.2.3 Bubble Dynamics: The Rayleigh – Plesset Equation

When the laser pulse is focused at the silica – absorbing layer interface, the laser energy is deposited into the titanium skin depth. By thermal conduction the rest of the titanium layer and first molecular layers of the bioink, located near the absorbing layer, are heated, producing a bioink vapor bubble and a fast expansion at the bioink-air interface. The growth phase of water bubbles in the bulk of a liquid has been studied in details (see [17] for instance). It has been shown that the growing – collapsing process could be described by the Rayleigh – Plesset equation, which states [18]:

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{kP_l}{\rho_l}\left(\frac{R_0}{R}\right)^{3\gamma} - \frac{P_l - P_v}{\rho_l} - 4\upsilon\frac{\dot{R}}{R} - \frac{2\sigma_l}{\rho_l R} \tag{3}$$

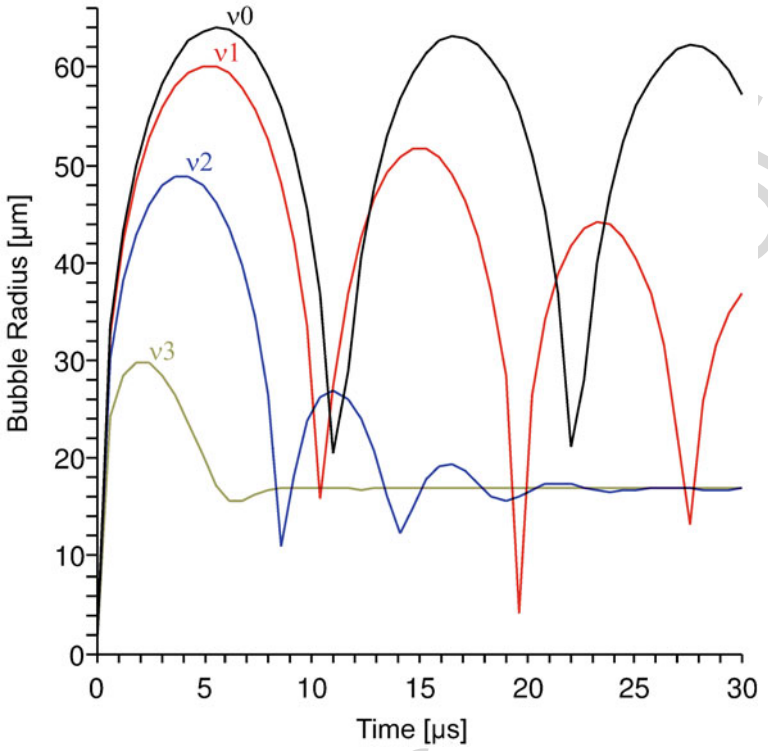
where R the vapor bubble radius, ρ_l the liquid density, P_l the liquid pressure, ν the kinematic viscosity, σ_l the surface tension, γ the ratio of specific heats, P_v the saturated pressure in the bubble and k the ratio of gas pressure in the bubble, P_g, to the liquid pressure P_l. This equation is the expression of the vapor bubble radius evolution versus time. It mainly depends on the liquid kinematic viscosity and surface tension. The evolution of a water bubble radius versus time is plotted in Fig. 6.2 for the following parameters: $\rho = 1{,}000$ kg·m^{-3}, $\nu = \nu_0 = 1.05\times10^{-6}$ m^2/s, $\sigma_l = 72$ mN.m–^{1}, $k = 50{,}000$, $R_0 = 1.26$ µm, $\gamma = 1.4$, $P_l = 1.105$ Pa and $P_v = 2{,}330$ Pa (for more details, see [19]) and for kinematic viscosity values corresponding to different hydrogel solutions (at 10°C):

$$v_1 = 10 \times 10^{-6}\frac{m^2}{s}\ (0.1\%\ \text{Alginate} + 30\%\ \text{Glycerol})\ ;$$

$$v_2 = 40 \times 10^{-6}\frac{m^2}{s}\ (0.5\%\ \text{Alginate} + 30\%\ \text{Glycerol})\ ;$$

$$v_3 = 108 \times 10^{-6}\frac{m^2}{s}\ (1\%\ \text{Alginate} + 30\%\ \text{Glycerol})\ ;$$

UNCORRECTED PROOF



This figure will be printed in b/w

Fig. 6.2 Radius (in µm) evolution vs. time (in µs) of a vapor bubble for different viscosities ($\nu_0 = 1.10^{-6}$ m^2/s/$\nu_1 = 10.10^{-6}$ m^2/s/$\nu_2 = 40.10^{-6}$ m^2/s/$\nu_3 = 108.10^{-6}$ m^2/s)

The higher the kinematic viscosity of the liquid, the lesser the bubble radius oscillates, the smaller the maximum vapor bubble radius, and the faster the maximum radius is reached (Fig. 6.2).

By adding a surfactant such as Sodium Dodecyl Sulfate, the surface tension of the hydrogel decreases from 72 to 65 mN/m, which seems to have no effect on the bubble radius evolution. Consequently, the bubble dynamics seems to be governed mainly by the kinematic viscosity of the solution.

6.2.4 Jet Formation: A Complex Threshold Mechanism

The Rayleigh-Plesset equation describes bubble dynamics in an infinite volume. Because the size of the vapor bubble is not negligible compared to the bioink thickness, the interactions of the bubble with the free surface have to be taken into account. Towards this end, Pearson et al. and Robinson et al. [20, 21] have demonstrated, (i) when the bubble reaches its maximum diameter, it begins to collapse

UNCORRECTED PROOF

under the external pressure strengths, and (ii) a jet may be formed according to the dimensionless standoff distance Γ (Equation 4), which is the ratio between the distance h (distance between the initial vapor bubble centroid and the free surface) and the maximum bubble radius, R_{max}.

$$\Gamma = \frac{h}{R_{max}} \tag{4}$$

In Equation 4, the maximum bubble radius, R_{max}, depends on laser energy, through the *k* ratio in the Rayleigh-Plesset equation, and viscosity of the bioink (see Fig. 6.2), while *h* is related to the thickness of the bioink film.

Experimentally, by printing different mixtures of alginate and glycerol, for a given laser energy, we have verified that the Γ ratio depends on the viscosity ν and the thickness *h* of the bioink film (Fig. 6.3). With a bioink made of 1% of alginate and 30% of glycerol and a bioink thickness of 20 μm, droplets were successfully printed onto the substrate (Fig. 6.3a). When the bioink thickness was increased up to 100 μm, the substrate remained clear of any droplets, whereas bubbles were observed onto the target (Fig. 6.3b). If the bioink viscosity is increased (3% w/v alginate and 30% Glycerol) and the bioink thickness is decreased (20 μm), bubbles are also observed onto the target (Fig. 6.3c).

Consequently, the three regimes generally observed in LIFT experiments (sub-threshold, jetting and plume regimes [10]) are not solely the result of laser irradiation conditions but, also, of rheological properties and film thickness of the bioink. In other words, jetting is not simply occurring on the basis of an energy threshold mechanism [15] but rather on the basis of a complex Γ(E, *h*, ν) threshold mechanism. Over a given laser energy for which a vapor bubble is formed at

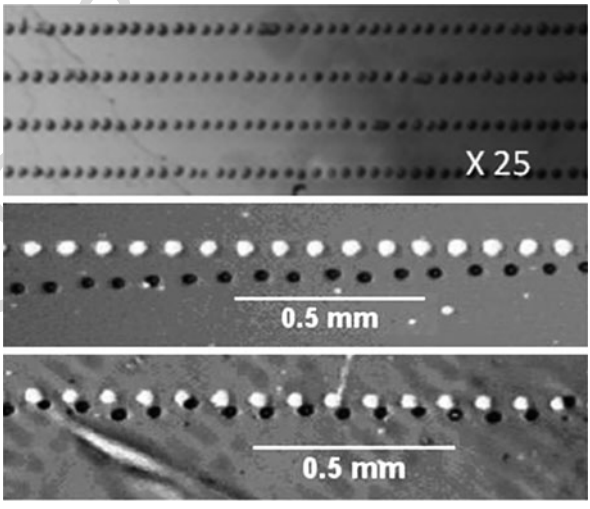


Fig. 6.3 (**a**) Droplets printed onto the substrate obtained with a mixture of 1% alginate and 30% glycerol and a bioink thickness of 20 μm. (**b**) Bubbles on the target obtained within a mixture of 1% alginate and 30% glycerol and a bioink thickness of 100 μm. (**c**) Bubbles on the target obtained with a mixture of 3% alginate and 30% glycerol and a bioink thickness of 20 μm. The *white* spots correspond to the laser impacts and the *black* ones to the bubbles

UNCORRECTED PROOF

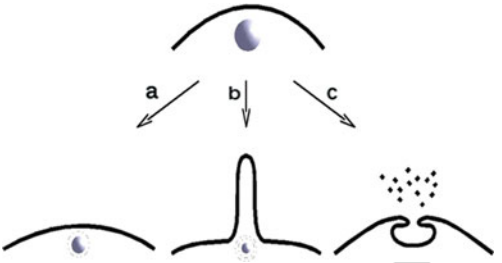


Fig. 6.4 The three LIFT regimes: (**a**) The subthreshold regime: $\Gamma(E, h, \nu) > \Gamma_1$, (**b**) the jetting regime: $\Gamma < \Gamma_2$, (**c**) the plume regime: $\Gamma_1 > \Gamma > \Gamma_2$

This figure will be printed in b/w

the absorbing layer – bioink interface, the three above-mentioned regimes can be distinguished (Fig. 6.4):

(i) If Γ is higher than a threshold value Γ_1: the droplet ejection cannot occur, unless the substrate is close to the target. These are the conditions to observe the sub-threshold regime (Fig. 6.4a).
(ii) If Γ is lower than a threshold value Γ_2: the bubble expands until it bursts, giving rise to the plume regime (Fig. 6.4b).
(iii) If Γ. is ranged between Γ_1 and Γ_2: the bubble expands, then collapses and finally a jet is formed (Fig. 6.4c). Integration of a High-Throughput BioLP workstation.

6.3 Integration of a High-Throughput BioLP Workstation

6.3.1 Terms of Reference

To design a High-Throughput Biological Laser Printer, various pulsed lasers were evaluated for their suitability with living cells and biomaterials as well as for rapid prototyping applications. Major requirements considered were:

(i) the wavelength λ should not induce alteration of biological materials, due to the potential denaturation of DNA by UV lighting, near infra-red lasers were preferable to UV lasers.
(ii) the pulse duration τ and the repetition rate f must be considered with the purpose of high throughput processes.
(iii) the beam quality, including divergence (q), spatial mode, and pulse-to-pulse stability (ptp) has to be taken into account to ensure the reproducibility, stability and high resolution of the system.

A laser-based workstation dedicated to tissue engineering applications should be designed with the purpose of executing various tasks rather than solely bioprinting.

UNCORRECTED PROOF

Consequently, the mean laser power should be high enough to perform additional processes such as micro-machining, sintering, polymerization.

6.3.2 Design

With regard to these criteria, a solid Nd:YAG crystal laser (Navigator I, Newport Spectra Physics) was selected with the following specifications (λ = 1,064 nm, τ = 30 ns, f =1–100 kHz, q = 3.4 mrad, TEM_{00}, ptp < 1,5% rms, P = 7 W). A 5-axe positioning system has been integrated to the workstation (NovaLase, S.A., Canéjan, France) with the purpose of printing multi-color patterns and building 3D biostructures. The substrate is held with a (x, y, z) motorized micrometric translation stage whose resolution is 1 μm for (x, y) axis and 5 μm for the z axis. In order to achieve multi-color printing, a high resolution (1° angular resolution) motorized carousel with a loading capacity of 5 different ribbons has been designed (Fig. 6.5b). Substrate positioning system and carousel are held on the same vertical axis in order to vary focusing conditions without changing the gap distance between each other.

Droplet generation from the ribbon surface is performed by steering the laser beam by means of a high speed scanning system composed of two galvanometric mirrors (SCANgine 14, ScanLab), with a scanning speed reaching 2,000 mm/s, and a large field optical F-theta lens (S4LFT, Sill Optics, France) (F = 58 mm).

This figure will be printed in b/w

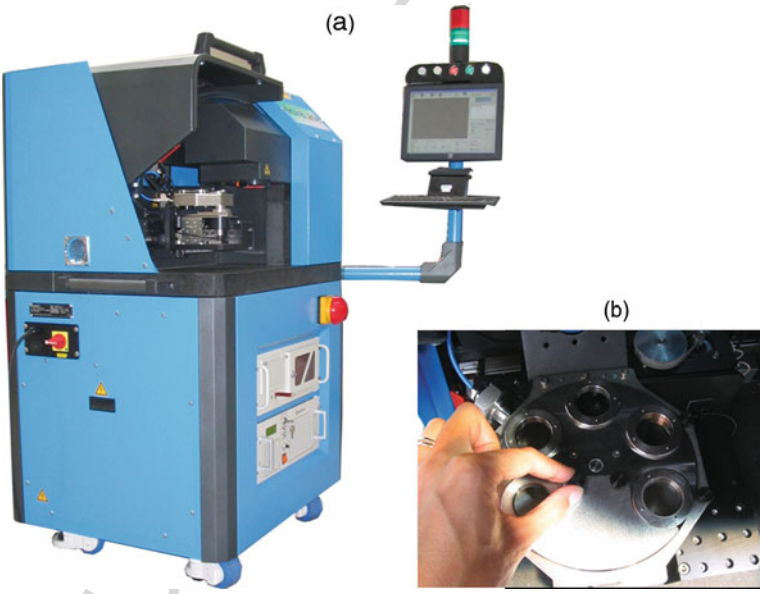


Fig. 6.5 (**a**) View of the high-throughput biological laser printer; (**b**) high resolution positioning system placed *below* the carousel holder with a loading capacity of 5 different ribbons

UNCORRECTED PROOF

Focal setting in the ribbon and (x, y, z) substrate positioning are assisted by a CCD camera through the optical scanning system. The integration of the laser and all above-mentioned components has been made possible using Solidworks® software. Substrate positioning, carousel driving, video observation and pattern designs are monitored with one dedicated software. Finally, this CAD/CAM workstation (Fig. 6.5a) has been placed in a cell culture room in order to allow cell printing experiments.

6.3.3 High-Throughput Printing Parameters

In HT BioLP technique, the spatio-temporal pulse proximity has to be taken into account in order to obtain a high printing resolution and reproducible results. In other words, both the distance and the time between laser spots have to be considered.

Regarding the distance between 2 spots, contiguous laser spots should not overlap each other to avoid an alteration of the energy conversed by the absorbing layer. The recovery area of two discs is given by the following formula:

$$A_{\text{rec}} = 2R^2 \arcsin\left(\frac{\sqrt{4R^2 - D^2}}{2R}\right) - \frac{D}{2}\sqrt{4R^2 - D^2} \tag{5}$$

with

$$D = \frac{v}{f} \tag{6}$$

which leads to the covering rate τ_{rec}:

$$\tau_{\text{rec}} = \left(\frac{A_{\text{rec}}}{\pi R^2}\right) \times 100 \tag{7}$$

where R is the laser impact radius, D the distance between two laser impacts, v the velocity of the scanner mirrors and f the laser repetition rate. Depending on A_{rec}, laser energy might be partially absorbed by the metal layer, which may alter droplet ejection.

Regarding time, the characteristic time is more related to the bubble lifetime than to the pulse duration. Indeed, as shown above, bubble growth and collapsing are much slower events (~10 μs) than the energy deposit (~10 ns) and are, in addition, strongly sensitive to the viscosity of the bioink (Fig. 6.2). Figure 6.6 is an example of coalescent bubbles due to spatio-temporal pulse proximity for a viscous bioink and different scanning velocities (laser repetition rate is 5 kHz). Hence, laser repetition rate (or alternatively scanning velocity) has to be taken into account to avoid coalescence of vapor bubbles within the thickness of the bioink.

UNCORRECTED PROOF

This figure will be printed in b/w

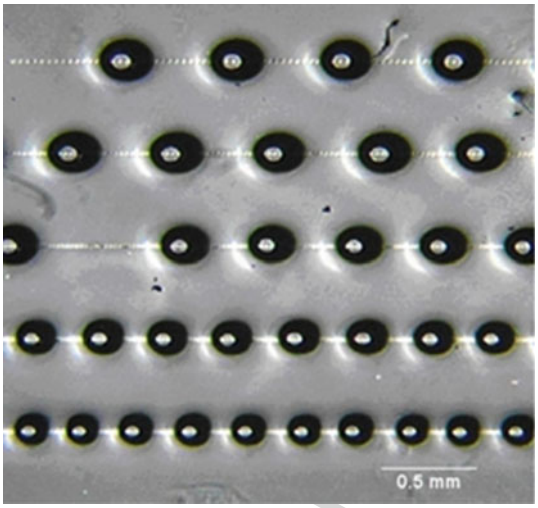


Fig. 6.6 Coalescence of successive vapor bubbles observed within viscous solutions and low scanning velocity (from the *top* to the *bottom* of the picture the scanning velocity are 150, 120, 100, 70 and 50 mm/s)

6.4 Results and Discussion

6.4.1 Cell Printing

6.4.1.1 Ink Composition Considerations

HT BioLP requires cells to be in a liquid suspension prior to being printed onto the substrate. However, extracellular matrix is critical for cell homeostasis in vivo. Also, in order to print a 3D material containing cells, the liquid ink should gel post printing onto the substrate. With respect to the layer-by-layer 3D building strategy, the gelling process is necessary (i) to stabilize the printed 2D pattern, (ii) to support subsequent ink layer. In addition, the gelling should not be harmful to the cells. According to these terms of reference, the cell containing ink was supplemented with 1% (w/v) alginate (Protanal 10/60, FMC Biopolymer) hydrogel as a preliminary approach to mimic extracellular matrix. The viscosity of different inks is shown in Table 6.2. It is noteworthy that 30% (v/v) glycerol added to a 1% (w/v) alginate

Table 6.2 Viscosity of culture media supplemented with alginate, glycerol, and cells. Glycerol is added to the ink to prevent evaporation. The cell model used in this experiment is the rabbit carcinoma cell line B16, at a density of 40.10^6 cell/mL. Experiment was carried on at 10°C

Solution in culture media (DMEM)	Vicosity (Pa.s)
Alginate 0.5% (w/v); glycerol 30% (v/v)	0.05
Alginate 1% (w/v)	0.1
Alginate 1% (w/v); glycerol 30% (v/v)	0.11
Alginate 1% (w/v); 40.10^6 cell/ml	0.12

UNCORRECTED

ink accounts for 10% of viscosity, while 40.10^6 cells/mL accounts for 20% of the viscosity. Other viscous solutions suitable for BioLP have been described by Othon et al. [22].

6.4.1.2 Viscosity and Laser Energy Deposit: Two Parameters that Influence Resolution

Printing resolution depends on the ink viscosity and the laser energy deposit. Laser energy deposit can be modulated by tuning laser power or diaphragm aperture stop. Table 6.3 shows that the ejected droplet diameter onto the substrate is correlated to viscosity and laser power. The higher the viscosity and/or the lesser the energy deposit, the smaller the droplet diameter. It is possible to achieve similar resolution, i.e. similar droplet size, with a 0.1% (w/v) alginate ink printed with a laser pulse energy of 6 μJ (droplet size: (49 ± 3.5) μm, $n = 15$), and with a 1% alginate (w/v) ink printed with a pulse energy of 12 μJ (droplet size: (51 ± 4.2) μm, $n = 15$). A wide range of extracellular matrices, characterized by as many different viscosities can thus be printed at a similar resolution.

Table 6.3 Diameter (in μm) of the ejected droplet onto the substrate, depending on alginate concentration in the ink, and laser power. The different inks were composed of mQ water supplemented with 30% (v/v) glycerol, with varying concentration of alginate. c: coalescence of contiguous droplets onto the substrate. n.t.: no transfer of the ink onto the substrate

Energy (μJ) alginate (w/v) (%)	4.5	6	7.5	9
0.1	49 ± 4 (*n*=15)	69 ± 4 (*n*=15)	C	c
0.5	38 ± 3 (*n*=15)	55 ± 5 (*n*=15)	64 ± 5 (*n*=15)	62 ± 6 (*n*=15)
1.00	n.t.	48 ± 4 (*n*=15)	46 ± 3 (*n*=15)	51 ± 4 (*n*=15)

6.4.1.3 High Cell Density Printing in High Spatial Resolution

HT BioLP nozzle free set up precludes the cell printing process from clogging issues. Thus, inks loaded with cell densities similar to densities observed in living tissue can be used. The effect of the cell suspension viscosity on printing resolution was addressed. Cell suspensions supplemented with or without 1% (w/v) alginate were compared (Fig. 6.7). Cells were printed at a density of 50 million cells/mL, according to the pattern of the Olympic flag. Results show splashing [15] occurs in absence of alginate (Fig. 6.7a). In presence of 1% (w/v) alginate, splashing is virtually absent (Fig. 6.7b). One percent alginate increased the solution viscosity up to 0.1 Pa.s. With such a viscosity, splashing of the ink onto the substrate is reduced, and thus the resolution of the printed pattern is increased.

As shown in Table 6.2, presence of cells into the ink impacts its viscosity. Laser parameters should then be adapted depending on the desired pattern to print. Different laser parameters were tested on two cell densities: 50 million cells/mL and 100 million cells/mL (Fig. 6.8). If droplet diameter is large enough, two contiguous

UNCORRECTED PROOF

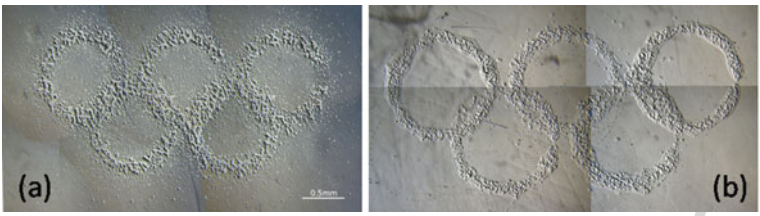


Fig. 6.7 Cellularized 2D pattern resolution according to viscosity. Fifty million cells per ml were suspended in DMEM supplemented with 10% glycerol (**a**) plus 1% (w/v) alginate (**b**) Satellite droplets (splashing) are virtually absent when 1% (w/v) alginate is added to the ink

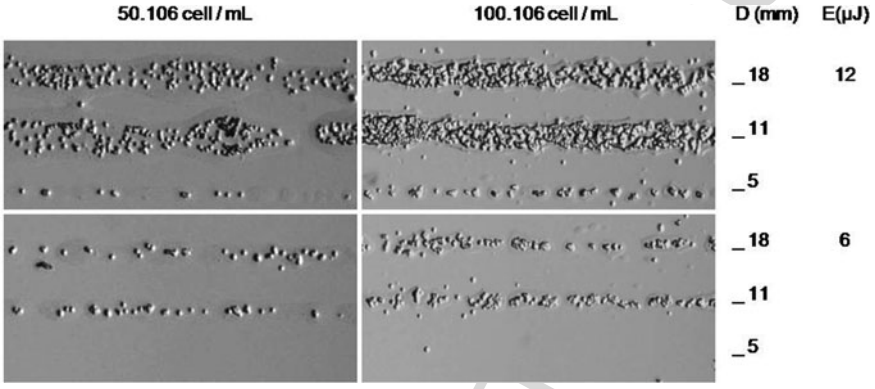


Fig. 6.8 Cell printing resolution according to the cell density in the ink (DMEM, 1% (w/v) alginate, 5% glycerol), the diaphragm aperture stop (D) and the laser energy deposit (P). Magnification 25×

printed droplets may coalesce, thus drawing a continuous line of cells. As a consequence, the higher the laser energy, the wider the printed cell line. Decreasing laser energy would then allow us to print cells one-by-one, next to each other. However, because HT BioLP is a LIFT based and nozzle free device, the number of cells in each ejected droplet is statistic. If cell density is too low on the ribbon, the ejected droplet of ink may not contain any cell (Fig. 6.8, upper left panel, diaphragm aperture stop $D = 5$ mm). To overcome this problem, at least two strategies can be proposed. (1) Increased laser energy leads to the ejection of bigger droplets. As a result, cells are more likely to be dragged off by draining/capillary effect (Fig. 6.8, upper left panel, $D = 18$–11 mm, and lower left panel, D = 11 mm). (2) Cell density can be increased up to the point cells are touching each other at the surface of the ribbon, i.e. 100 million cells/mL. In such a case, the viscosity of the ink is increased, and a higher laser energy deposit is necessary for printing (Fig. 6.8, upper right panel, $D = 5$ mm). A third strategy would implement a 'aim and shoot' technology into the HT BioLP device.

In conclusion, HT BioLP is suitable to print versatile patterns such as cell clusters, cell banners and cell lines according to desired pattern (Fig. 6.9). Also,

This figure will be printed in b/w

UNCORRECTED PROOF

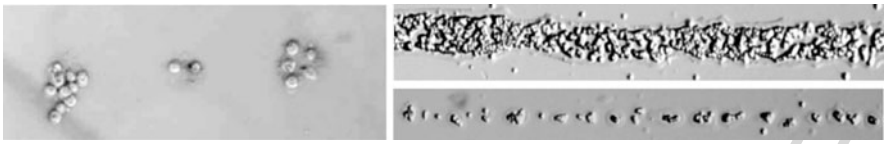


Fig. 6.9 Basic cell patterns printed by HT BioLP. Single drop of ink containing varying number of cells can be printed at desired coordinates (*left panel*, magnification 200×). If drops of ink are printed close enough to each other onto the substrate, they may coalesce and form continuous line (*upper right panel*, magnification 25×). By adjusting energy deposit with suitable viscosity/cell density of the ink, cells could be printed one by one, at a cell-level resolution (*lower right panel*, magnification 25×)

cell-level resolution of cell organization is achievable by this LIFT based method to print cells in high throughput conditions (5 kHz). Optimization is possible in terms of higher throughput and higher resolution.

6.4.2 2-Dimensional Printing of Nano-Hydroxyapatite

For bone tissue engineering applications of HT BioLP, a 'bio-mimetic' approach was chosen: it consisted in the printing of the individual components of bones. This tissue is composed of nano-sized hydroxyapatite crystals embedded in a protein matrix mainly composed of type-1 collagen [23].

In order to prepare the printable mineral phase of this tissue, a nano-hydroxyapatite slurry (nHA) was synthesized by wet chemical precipitation [24] Briefly, a 0.6 M phosphoric acid solution was added dropwise into a 1 M calcium hydroxide solution and was kept at ambient temperature and pH 9 during 24 h under constant stirring. Then, 30% Glycerol (v/v) was added to the solution to improve the viscosity of the slurry and to prevent vaporizing of the material [25]. A thin film (30 μm) of the solution was coated on the ribbon with a 'doctor blade' device.

The HT BioLP parameters were first adjusted to print a matrix of droplets; the scanner speed was 300 mm/s, and the energy per pulse was comprised between 6 and 12 μJ. This lead to the formation of droplets ranging from 40 to 100 μm wide, depending on the laser energy [15], i.e., the higher the laser energy the larger droplets (Fig. 6.10), and a threshold appeared at 12 μJ after which droplets were not well defined and lead to the formation of splashing.

In this experiment, it appeared that the nanometric size of the hydroxyapatite crystals and their homogeneous size distribution in solution played an important role in the printing resolution.

6.4.3 3-Dimensional Printing of Nano Sized Hydroxyapatite

For tissue engineering applications and building of composite structures for tissue repair, three-dimensional printing is admitted to be a critical issue [26]; towards this

UNCORRECTED PROOF

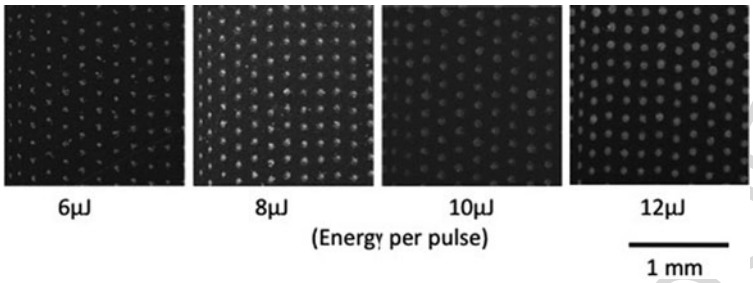


Fig. 6.10 nHA droplets printed with several laser energies. The higher energy, the larger droplets

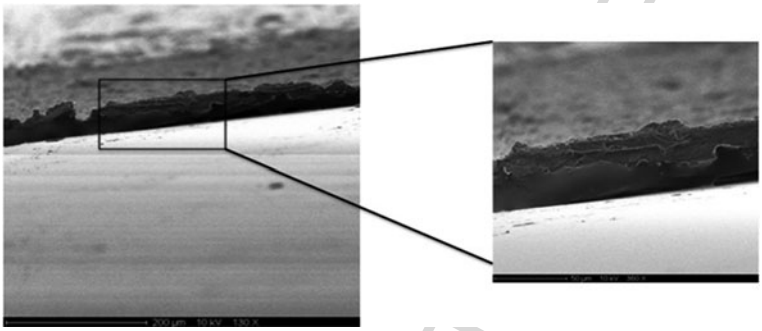


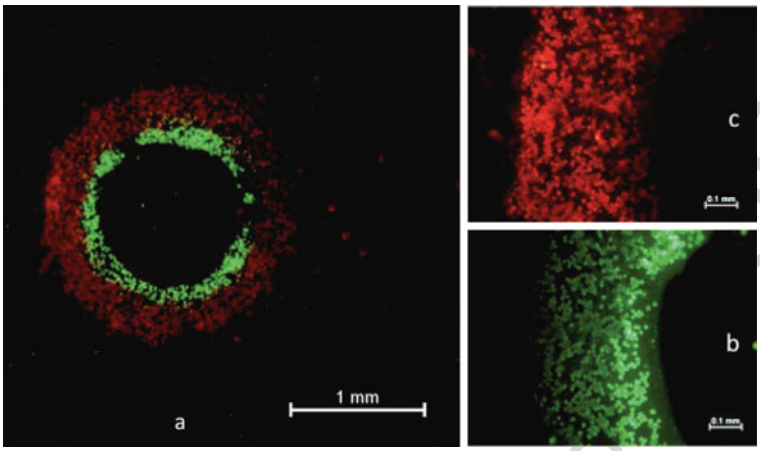
Fig. 6.11 Three Dimensional printing of 15 superimposed layers of nHA observed by Scanning Electron Microscopy parallel to the receiving substrate. *Left image*: low magnification (x130) of the printed material. *Right image*: higher magnification (x360) of the 'step' (50 μm high) created by the stacked layers of nHA

end, the bioprinting device should be able to print stacks of material. A nHA solution was printed in several stacks to obtain a three dimensional structure (Fig. 6.11). Fifteen (stacked) layers of n-HA can be observed by scanning electron microscopy. This 3D structure has an average thickness of 45 μm. In this case, the material was highly compacted after the printing. In order to build a 3D porous structure, some sacrificial material layer [27] could be printed concomitantly with nHA to produce the desired porosity into the material.

6.4.4 Multicolor Printing

Since biological tissues are composed of multiple components in close interactions with each other (cells of different types, extracellular matrix, etc. . .), not only 3 dimensional structures but also multiple 'colors' of biological materials should be considered in a tissue engineering product. Figure 6.12 illustrates the multicolor printing capability of the HT BioLP. Two distinct suspensions of cells (human

UNCORRECTED PROOF



This figure will be printed in b/w

Fig. 6.12 Sequential two color cell printing in 2D. Human endothelial cell line (Ea hy 926) were loaded with 4 mM of Calcein-AM (**b**) or with fluorescent Dil-LDL (**c**) prior to the experiment. The two cell suspensions (60.10^6cells/mL) in DMEM, supplemented with 1% (w/v) alginate were then printed according to a pattern of concentric circles (**a**). The two cell suspensions were each blade coated onto two separate ribbons. Both ribbons were placed onto the wheel distributor of the HT BioLP. Calcein loaded cell suspension was used to print the inner circle (1.2 mm diameter). Dil-LDL loaded cell suspension was used to print the outer circle (1.6 mm diameter). The overlay of Fig. 6.3b, c shows the two circles partially overlap due to the coalescence of the two circles

endothelial cell lineage Eahy926, 60 million cells /ml) were sequentially printed in 2 dimensions according to a pattern of two concentric circles (Fig. 6.12a). The inner circle was printed first using a suspension of cells loaded with green fluorescent calcein (Fig. 6.12b). Secondly, the outer circle was printed using a suspension of cells loaded with red fluorescent Dil-LDL (Fig. 6.12c). Differential staining of the cells revealed the two circles overlapped, which was likely due to bioink coalescence between the two circles. This experiment shows it is possible to print cells in close contact to each other, with a high cell concentration, according to a desired spatial organization. The printing resolution achievable by the HT BioLP is consistent with the study of cell-to-cell, or cell-to-material interaction as well.

6.4.5 In Vivo Printing

To the best of our knowledge, all previous bioprinting studies involve in vitro experiments. We have performed some preliminary assays for in vivo printing [28]. More precisely, the purpose of our study was to fill a critical sized calvarial bone defect in mouse by printing a hydroxyapatite slurry (as prepared in Section 6.3.2). Briefly, the defects were performed bilaterally in mouse calvaria under general anesthesia, leaving the dura mera exposed. Then, the animals were placed inside the HT BioLP workstation. A specific mouse holder was designed in order to print the bioink onto the mouse dura mera instead of the quartz substrate depicted in Fig. 6.1. Then,

UNCORRECTED PROOF

This figure will be printed in b/w

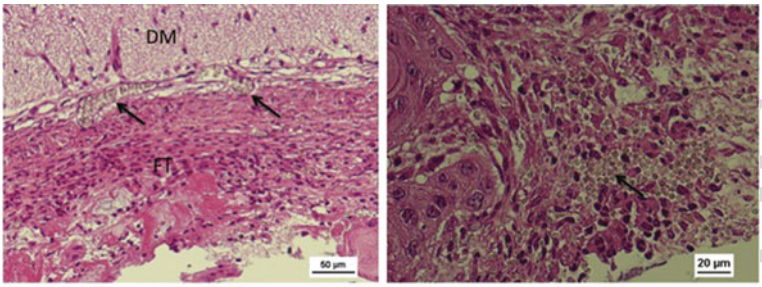


Fig. 6.13 In Vivo printing of nHA. Histological sections of mouse calvarial defects after 1 week. (**a**) nHA aggregates are present in close contact to the dura mera (*arrows*). (**b**) Higher magnification of nHA aggregates. (DM: Dura Mera; FT: Fibrous Tissue)

30 nHA layers were printed inside one defect. The contro-lateral defect was used as negative control. Three groups of 10 animals each were studied. Animals were sacrificed after 1 week, 1 month or 3 weeks, respectively. The histological results have shown that the material was present in the test defects of all the groups (Fig. 6.13). However, bone repair was inconstant. As a conclusion, we show in vivo bioprinting is possible. Future experiment in this model should improve the mechanical and biological properties of the printed material.

6.4.6 Discussion

Hypothesizing the innocuity of bioprinting technologies in regards to cell fate and biomaterial properties, we propose the definition of a bioprinting efficiency coefficient (BEC) which could also convey the bio-manufacturing rate. The dimensional equation of bio-manufacturing rate could be written as:

$$\mathrm{BEC} = \frac{L^3}{T} = \frac{L}{T} \times L^3 \times \frac{1}{L} \tag{8}$$

$$\mathrm{BEC} = \frac{\text{speed} \times \text{volume}}{\text{resolution}} \tag{9}$$

In Equation (9), speed, volume and resolution could be defined as the bioprinter writing speed (m/s), the typical volume of cells or biomaterials deposited per droplet (μm^3) and the printing resolution (μm), respectively. The higher the BEC, the more efficient the bioprinting process for building 3D structures.

Obviously, the high resolution criterion, which is required to precisely position cells, growth factors and other biomolecules, counterbalance the volume criterion. To address this latter issue, building 3D bio-structures would proceed from a combination of processes and technologies interacting with bioprinting and not only through the 3D deposit of microdroplets of cells and biomaterials [26]. Towards this

UNCORRECTED PROOF

end, some authors have introduced the principle of bioprinting on biopapers [4]. More generally, additional technologies such as fused deposition modeling [29], aerosols [30], electrospinning [31] as well as optically driven methods (such as photo-polymerizing, micro-machining, laser catapulting [32], LGDW [8],. . .) would thus be combined with bioprinting when the micro-architecture and the cell micro-environment of some tissue parts or layers do not require a precise positioning of components. Consequently, a coefficient expressing the integrability or the interacting capacity of the bioprinting method has to be introduced in equation [9], leading to:

$$\mathrm{BEC} = \text{integrability} \times \frac{\text{speed} \times \text{volume}}{\text{resolution}} \tag{10}$$

Finally, as regards BEC rate and because a high-throughput biological laser printer could be easily combined with other laser-based processes, Tissue Engineering Assisted by Laser should become more important in the near future. This capacity of combining different optical monitored processes is indeed, in our opinion, one of the major advantages of laser printing *vs.* traditional bioprinting methods involving either thermal or piezoelectric ink-jetting as well as pin depositing. In the future, such additional optical processes would include, but not be limited to, micro-machining, cutting, photo-polymerizing, sintering, etc.

6.5 Conclusions and Perspectives

In this chapter, we have shown that High-Throughput Biological Laser Printing (HT-BioLP) requires to take into account spatio-temporal proximity of laser pulses as well as the rheological properties of the bioink since the droplet ejection mechanism is mainly governed by vapor bubble dynamics. Hence, jetting thresholds are discussed as regards the dimensionless parameter Γ which is the ratio between the initial bubble centroid and the free surface. After the development of a high-throughput biological laser workstation, we have also shown its potentiality for depositing a wide range of biological components, all of which are required for tissue engineering: biopolymers, nano-sized particles of hydroxyapatite as well as human endothelial cells. Then, after describing experimental conditions leading to the high resolution printing of biological components, we present some typical multi-component and 3D printings achieved using this workstation. These results lead us to emphasize the criteria that are required for building 3D structures through bioprinting process: the writing speed, volume fraction of deposited materials, process resolution and its capacity to be combined with other tissue engineering methods.

Acknowledgments The authors would like to thank GIS ‘Advanced Materials in Aquitaine’ and Région Aquitaine for financial support. In addition, the authors would like to thank Reine Bareille and Murielle Rémy for their help in cell culture experiments.

UNCORRECTED PROOF

References

1. Hutmacher DW (Déc 2000) Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 21(24):2529–2543
2. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR (Avr 2003) Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends Biotechnol 21(4):157–161
3. Jakab K, Norotte C, Damon B, Marga F, Neagu A, Besch-Williford CL, Kachurin A, Church KH, Park H, Mironov V, Markwald R, Vunjak-Novakovic G, Forgacs G (Mar 2008) Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. Tissue Eng A 14(3):413–421
4. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR (Avr 2009) Organ printing: tissue spheroids as building blocks. Biomaterials 30(12):2164–2174
5. Boland T, Xu T, Damon B, Cui X (Sep 2006) Application of inkjet printing to tissue engineering. Biotechnol J 1(9):910–917
6. Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, Iwasaki Y, Horie M, Morita I, Takatani S (13 Jan 2006) Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. [Internet] [cité 17 Sep 2008]. Available from http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.2005.11.1658
7. Saunders RE, Gough JE, Derby B (Jan 2008) Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. Biomaterials 29(2):193–203
8. Nahmias Y, Schwartz RE, Verfaillie CM, Odde DJ (2005) Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. Biotechnol Bioeng 92(2):129–136
9. Nahmias Y, Odde DJ (21 Déc 2006) Micropatterning of living cells by laser-guided direct writing: application to fabrication of hepatic–endothelial sinusoid-like structures. [Internet] [cité 17 Sep 2008]. Available from http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n5/pdf/nprot.2006.386.pdf
10. Young D, Auyeung RCY, Piqué A, Chrisey DB, Dlott DD (Sep 2002) Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy. Appl Surf Sci 30:197–198, 181–187
11. Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB (Avr 2004) Application of laser printing to mammalian cells. Thin Solid Films 453–454:383–387
12. Hopp B, Smausz T, Kresz N, Barna N, Bor Z, Kolozsvári L, Chrisey DB, Szabó A, Nógrádi A (13 Jan 2006) Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. [Internet] [cité 17 Sep 2008]. Available from http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.2005.11.1817
13. Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR (June 2004) Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. Biomed Microdevices 6(2):139–147
14. Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR (Fév 2005) Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. Ann Biomed Eng 33(2):121–130
15. Duocastella M, Colina M, Fernández-Pradas J, Serra P, Morenza J (July 2007) Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. Appl Surf Sci 253(19): 7855–7859
16. Duocastella M, Fernández-Pradas J, Serra P, Morenza J (1 Nov 2008) Jet formation in the laser forward transfer of liquids. Appl Phys A Mater Sci Process 93(2):453–456
17. Brennen CE (1 Jan 1995) Cavitation and bubble dynamics. [Internet] [cité 23 Jul 2009]. Available from http://caltechbook.library.caltech.edu/1/
18. Xiu-Mei L, Jie H, Jian L, Xiao-Wu N (2008) Growth and collapse of laser-induced bubbles in glycerol–water mixtures. Chinese Phys B 17(7):2574–2579
19. Mézel C, Hallo L, Souquet A, Guillemot F, Breil J Self-consistent modeling of a LIFT process in the nanosecond laser pulse regime. Phys Plasma (submitted) (2009), 16(12):123112-12
20. Pearson A, Cox E, Blake JR, Otto SR (Avr 2004) Bubble interactions near a free surface. Eng Anal Bound Elem 28(4):295–313

AQ2

UNCORRECTED PROOF

21. Robinson PB, Blake JR, Kodama T, Shima A, Tomita Y (15 Juin 2001) Interaction of cavitation bubbles with a free surface. J Appl Phys 89(12):8225–8237
22. Othon CM, Wu X, Anders JJ, Ringeisen BR (2008) Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells. Biomed Mater 3(3):034101
23. Cowin S, Author, Telega J, Reviewer (0 Juillet 2003) Bone mechanics handbook, 2nd edn. – Appl Mech Rev 56(4):B61–B63
24. Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri MR, Sorrell CC (Mai 2003) Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. Mater Des 24(3):197–202
25. Catros S, Fricain J, Guillotin B, Pippenger B, Bareille R, Laplaud E, Desbats B, Amédée J, Guillemot F High-throughput laser printing of nano hydroxyapatite and human osteoblasts for bone tissue engineering. ~~Acta Biomater~~ (submitted)
26. Boland T, Tao X, Damon BJ, Manley B, Kesari P, Jalota S, Bhaduri S (Avr 2007) Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs. Mater Sci Eng C 27(3):372–376
27. Lee W, Debasitis JC, Lee VK, Lee J, Fischer K, Edminster K, Park J, Yoo S (March 2009) Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. Biomaterials 30(8):1587–1595
28. Kériquel V, Guillotin B, Arnault I, Miraux S, Amédée J, Guillemot F, Fricain J, Catros S In vivo high-throughput biological laser printing of nano-hydroxyapatite in mice calvarial defects. Biofabrication (submitted) (2010) 2(1):014101.
29. Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH (Fév 2002) Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. Biomaterials 23(4):1169–1185
30. Gagné L, Rivera G, Laroche G (Nov 2006) Micropatterning with aerosols: application for biomaterials. Biomaterials 27(31):5430–5439
31. Prabhakaran MP, Venugopal J, Chyan TT, Hai LB, Chan CK, Tang ALY, Ramakrishna S (25 July 2008) Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering. Tissue Eng A [Internet] [cité 30 Sep 2008]. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657027
32. Vogel A, Lorenz K, Horneffer V, Huettmann G, von Smolinski D, Gebert A (31 Aoû 2007) Mechanisms of laser-induced dissection and transport of histologic specimens. Biophys J biophysj.106.102277

AQ3

AQ4

UNCORRECTED PROOF

Chapter 6

Q. No.	Query
AQ1	Please specify the significance of "□".
AQ2	Please update reference [19]
AQ3	Please update reference [25]
AQ4	Please update reference [28]

UNCORRECTED PROOF