

# Capsules bioactives de multicouches pour l'induction osseuse

## Bioactive multilayered capsules for the in vivo bone formation

S Facca [1, 2], A Ferrand [1], C Mendoza-Palomares [1, 3], F Fioretti [1, 3], D Mainard [4], P Liverneaux [2], N Benkirane-Jessel [1, 4]

1. Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Unité 977, Faculté de médecine, 67085 Strasbourg Cedex, France.

2. Service de chirurgie de la main, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, CCOM, 67401 Illkirch Cedex, France.

3. Université de Strasbourg, Faculté de chirurgie dentaire, Strasbourg, France.

4. Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Hôpital Central, service d'orthopédie, et UMR 7561, CNRS-Université Henri Poincaré Nancy I, 54000 Nancy, France.

### Mots clés

- ◆ Capsules multicouches
- ◆ BMP-2
- ◆ TGFβ1
- ◆ Corps embryoides
- ◆ Ostéoblastes
- ◆ Os
- ◆ Induction osseuse

### Résumé

L'ingénierie tissulaire a vu émerger dans la dernière décennie une technologie concernant l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses. Son but est de développer des nouvelles sources de biomatériaux 3D transplantables et utilisables pour le traitement des traumatismes de l'appareil locomoteur ou des pathologies dégénératives du tissu osseux. Dans le cadre de l'ingénierie osseuse, l'application de cette technique peut être la régénération du tissu osseux. Lorsque les mécanismes de réparation sont insuffisants, le matériau fonctionnalisé entraînerait une différenciation des cellules de la lignée osseuse et une biominéralisation de la matrice extracellulaire.

Comme biomatériau, nous avons choisi un système de capsule construit sur le modèle couche par couche avec du poly- $\ell$ -glutamic acid (PGLA) et du poly- $\ell$ -lysine (PLL) incorporant deux facteurs de croissance osseux (BMP-2 et TGFβ1). Ces capsules de nanostructurées biofonctionnalisées avec des facteurs de croissance incorporés au sein de leur multicouche peuvent induire une différenciation osseuse des cellules souches embryonnaires. In vitro, ces capsules bioactives ont été testées pour leur capacité à induire une expression ostéogénique en présence de ces cellules, puis ont été implantées sur des souris nude in vivo. Après explantation, les capsules et leur tissu périphérique ont été analysés par histologie, immunofluorescence et microscopie électronique.

Nos résultats prouvent que nous sommes capables d'induire in vitro et in vivo la formation de tissu osseux par les cellules souches embryonnaires via ces capsules de multicouches incorporant deux facteurs de croissance osseux. Notre objectif à long terme est de produire des biomatériaux avec une matrice, des cellules ostéoprogénitrices et des facteurs de croissance permettant la réparation d'importants défauts osseux.

### Keywords

- ◆ Multilayered capsules
- ◆ BMP-2
- ◆ TGFβ1
- ◆ Embryoïd bodies
- ◆ Osteoblastes
- ◆ Bone osseinduction

### Abstract

New concepts of tissue engineering are being developed for treatment of traumatic bone defects or degenerative bone diseases, including cell grafting using cells grown in biomaterials with bone growth factors and stem cell technology, as a source of transplantable material. Embryonic stem cells represent a source for cell transplantation because of their multi-lineage differentiation potential.

The differentiation of stem cells to bone cells using bi-functionalized multilayered capsules is presented. The functionalized nanostructured capsules are composed of poly-glutamic acid (PGA) and poly-L-lysine (PLL) with two bone growth factors (BMP-2 and TGFβ1) embedded into the multilayered film. Recently, we have shown that we are able to induce bone formation by using embryonic stem cells and multilayered capsules incorporating BMP-2 and TGFβ1.

These findings suggest that it is possible to differentiate these cells on the multilayered capsules bi-functionalized by appropriate growth factors. We have reported for the first time that embedded BMP-2 and TGFβ1 into multilayered nanostructured capsules can drive embryonic stem cells to bone differentiation not only in vitro but also in vivo.

These results indicated clearly that we are able to propose a biomaterial coated with multilayer capsules able to interact with cells by inducing specific differentiation depending of the embedded active molecules. Our broad long-term objective is to provide combinations of osteoprogenitor cells and active scaffolds, coated by embedded growth factors, sufficient to repair large scale bone defects and to determine if viable grafts can be obtained from both embryonic stem cells and derived material.

### Correspondance :

Dr Sybille Facca, SOS main, 10 avenue Baumann, 67400 Illkirch.

E-mail : [sybille.facca@chru-strasbourg.fr](mailto:sybille.facca@chru-strasbourg.fr)

Les maladies du squelette osseux résultent le plus souvent d'un déséquilibre entre l'ostéof ormation et la résorption osseuse. Le processus de réparation osseuse peut être mis en défaut dans le cadre de plusieurs pathologies affectant le tissu osseux, soit de façon généralisée, soit de façon localisée. Induire et stimuler la régénération osseuse reste un défi pour le chirurgien orthopédiste confronté dans sa pratique quotidienne à l'ostéoporose, à la lyse tumorale ou au retard de consolidation. De nombreux biomatériaux fonctionnalisés visant l'induction de réponses cellulaires ou tissulaires spécifiques ont été développés durant la dernière décennie. Ils sont fréquemment obtenus par modification de la surface du matériau à travers des voies aussi diverses que la physisorption, le greffage covalent ou le dépôt d'un film Langmuir-Blodgett. Une des approches originales utilisées au sein de l'unité INSERM U977 de l'Université de Strasbourg est une adsorption alternée de poly-électrolytes chargés positivement (polycations) et négativement (polyanions), qui mène à la construction de films de multicouches. Ces films peuvent être fonctionnalisés par l'insertion de protéines (ligands) (1) ou de poly-électrolytes sur lesquels ont été couplés de façon covalente des peptides interagissant avec les récepteurs cellulaires (2, 3). Il a été démontré, au sein du laboratoire INSERM U977, que des facteurs de croissance osseux (BMP-2 et TGF- $\beta$ ) incorporés dans un film plan de multicouches pouvaient induire *in vitro* la différenciation de cellules souches en cellules osseuses (4). Cette stratégie intéressante nécessite néanmoins, pour une utilisation *in vivo*, l'implantation du substrat sur lequel nous avons construit le film de multicouches et incorporé les facteurs de croissance. Afin de s'affranchir de ce facteur limitant, une autre stratégie consiste à utiliser des capsules de multicouches (5), fonctionnalisées (6, 7), mais dans ce cas injectables ou alors incorporables dans un gel biodégradable pour faciliter leur implantation. L'objectif de ce travail a été de préparer et de caractériser des capsules de multicouches, fonctionnalisées ou pas avec des facteurs de croissance osseux (BMP-2 et TGF- $\beta_1$ ), d'obtenir des corps embryoides (EB) à partir de cellules souches embryonnaires de souris, puis d'étudier l'effet de ces capsules nanostructurées bioactives *in vitro* et *in vivo* sur la différenciation des EB en lignée ostéoblastique et sur la biominéralisation du tissu osseux ainsi induit.

## Matériel et méthodes

Pour cette étude nous avons choisi d'incorporer, dans nos capsules, deux facteurs de croissance osseux : BMP-2 et TGF- $\beta_1$ . Des particules de silice de 1  $\mu$ m de diamètre ont été enrobées par la technique de multicouches avec 5 paires de couches de poly-électrolytes constituées de : P $\ell$ L, Poly-( $\ell$ -lysine) hydrobromide (P $\ell$ L, P.M=30,3 KDa) et de P $\ell$ GA, acide Polyglutamique (P $\ell$ GA, P.M=47,5 KDa). Différentes architectures ont été préparées : des capsules « témoin négatif » : (P $\ell$ L-P $\ell$ GA)<sub>5</sub>-P $\ell$ L et des capsules bioactives fonctionnalisées : (P $\ell$ L-P $\ell$ GA)<sub>5</sub>-P $\ell$ L-BMP2-P $\ell$ L-TGF $\beta$ 1-P $\ell$ L. Puis les noyaux de silice ont été dissous par addition d'acide fluorhydrique. Une fois les capsules formées, la bonne construction des capsules a été vérifiée par deux techniques. Avec la technique de microbalance à cristal de quartz qui repose sur les propriétés piézo-électriques d'un cristal pour mesurer la masse adsorbée sur ce cristal, on a pu mesurer une variation de fréquence lors des dépôts successifs des couches de poly-électrolytes. On a pu ainsi suivre la construction du film de multicouches de poly-électrolytes, son épaisseur sur plusieurs centaines de nanomètres, ainsi que ses propriétés mécaniques tels que la viscosité et le module élastique. Pour la technique de microscopie confocale à fluorescence, les capsules ont été marquées à l'aide de fluorophores couplés aux poly-électrolytes (P $\ell$ L<sup>FITC</sup>). Un laser a permis d'exciter les électrons des capsules marquées et ceux-ci reviennent à leur état fondamental en émet-

tant un rayonnement lumineux que l'on a pu mesurer. La spécificité de la microscopie confocale à balayage laser est d'obtenir une image précise d'un point focal. Il est possible d'obtenir des images en provenance de différents plans focaux et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions (3D). Cette technique a été particulièrement intéressante pour étudier et comparer la structure normale de nos capsules multicouches fluorescentes fonctionnalisées ou pas avec les deux facteurs de croissance.

Pour l'étude *in vitro* et *in vivo*, des cellules souches embryonnaires (ES) de souris de la lignée D3 ont été gardées au stade indifférencié (8) avant d'obtenir des corps embryoides (EB), qui ont la capacité de se différencier en lignée ostéoblastique. Pour induire une différenciation des ES, on a cultivé les cellules selon le système de « gouttes pendantes » sur plaque retournée (9). Dans une première étape, on prélève une goutte de 20  $\mu$ L de milieu de culture contenant 1000 cellules ES qui sont déposées sur la face interne du couvercle d'une plaque qui est ensuite remis en position normale. Au bout de 48 heures, les cellules se sont rassemblées au fond de la goutte, les ES se sont agrégées et ont formé un corps embryoides. Ces EB sont maintenus en suspension entre le 3e et le 5e jour dans une boîte à « adhérence ultra-lente » pour leur permettre de continuer leur développement avec un milieu de culture supplémenté en insuline, acide ascorbique et sérum foetal bovin. Enfin, les EB sont prélevés individuellement et ensemencés sur lamelles dans des plaques de 24 puits. Ils vont alors adhérer à la surface, la différenciation cellulaire va se poursuivre et les premières zones battantes peuvent être généralement détectées, puis disséquées sous une loupe binoculaire et dissociées à l'aide d'un traitement à la collagénase.

Dans un premier temps, l'activité biologique des capsules fonctionnalisées ou pas par les facteurs de croissance : BMP2 [10 ng/mL] et TGF $\beta$  [2 ng/mL] ont été testés *in vitro* sur ces cellules souches embryonnaires. Dans un second temps, on a implanté ces capsules avec les EB sur des souris *nude* de la lignée MF1 -nu/nu. Toutes les procédures, pour notre étude, de soins, d'élevage, d'anesthésie et d'opérations au sein de l'animalerie sur les animaux se sont déroulées selon le livre de bord d'expérimentation animale de la Faculté de médecine de Strasbourg, la réglementation en cours du code rural et les règles de bioéthique. Dix souris mâles ont été acclimatées pendant deux semaines dans l'animalerie avant d'entamer l'expérimentation. Elles pesaient alors entre 28 et 32 grammes et étaient âgées de 4 à 5 semaines. Différents échantillons de capsules (fonctionnalisées ou pas) ont d'abord été incubés dans le gel d'alginate (utilisé comme substrat pour l'implantation *in vivo*) et mis en culture 5 jours avant implantation. Dans le gel implanté, dans lequel seront ajoutées nos EB, la concentration en capsules était de 1000 capsules par EB. Les souris ont été anesthésiées au pentothal et les différentes capsules avec ou sans gel d'alginate ont été implantées en position sous-cutanée en regard de la région cervicale. Après une incubation *in vivo* de 4 semaines, les souris ont été euthanasiées, pour procéder à l'extraction des implants et du tissu sous-cutané adjacent.

Pour s'assurer qu'il y a bien induction osseuse, nous avons observé en microscopie optique et microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET) : le phénotype et le génotype des cellules, issues des tests *in vitro* et issues des implantations *in vivo*. Les échantillons ont été fixés dans du milieu de fixation Karnovsky, avec du tétraxide d'osmium à 1 % dans 0.1M de tampon de cacodylate pendant une heure à 4°C, puis déshydratés par de l'alcool et inclus dans de l'Epon 812. Des coupes d'épaisseurs moyennes de 2  $\mu$ m ont été réalisées puis colorées par du bleu de toluidine et analysées histologiquement en microscopie optique à différents grossissements. On a observé et comparé la différenciation des EB en présence des capsules plus ou moins fonctionnalisées avec BMP2 et TGF $\beta$ 1. Pour la MEB, les échantillons ont été fixés,

déshydratés comme au-dessus, séchés avec un appareil au point critique de séchage puis montés sur de l'aluminium, couverts avec de l'or-palladium et coupés en utilisant un « *cold sputter-coater* » et observés avec un microscope Philips XL-20. Pour la MET, des coupes ultrafines à 70 nm ont été réalisées, la prise de contraste a été réalisée avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb, puis les coupes ont été examinées avec un microscope électronique Morgagni 268D Philips.

Puis, nous avons identifié et comparé s'il y avait ou non biominéralisation de la matrice extra-cellulaire (MEC) induite par les capsules, avec ou sans facteurs de croissance, *in vitro* comme *in vivo*. Nous avons analysé la synthèse de collagène I en MET. En effet, lors du processus de biominéralisation, la quantité de collagène I sécrétée par l'ostéoblaste tend à augmenter. La présence de collagène I, sa taille, sa bonne quantité et son organisation sont des marqueurs du bon déroulement du processus de biominéralisation. Puis, nous avons réalisé une coloration de Von Kossa. Après 21 jours de culture, les cellules différenciées des EB ont été colorées pendant 30 minutes par du nitrate d'argent à 2,5 % puis après deux lavages les cellules ont été colorées pour le comptage avec du bleu de toluidine à 0,1 %. La présence de structures minéralisées en noir (cristaux d'hydroxyapatite) est ensuite enregistrée par une *cool snap* caméra couplée à un microscope Leica DRBH. Enfin, nous avons analysé l'expression d'ostéopontine par immunofluorescence. L'ostéopontine est une sialoprotéine phosphorylée de la MEC, devant jouer un rôle dans la régulation de la biominéralisation osseuse. Par immunocytochimie, les cellules ont été traitées avec un anticorps monoclonal de souris anti-ostéopontine, puis par un second anticorps, un anticorps IgG anti-souris Cy3. Les cellules sont marquées par un traitement au Hoechst, afin de visualiser les noyaux (ADN). L'immunocoloration pour l'expression cellulaire d'ostéopontine est monitorée par une *cool snap* caméra couplée à un microscope Leica DRB doté d'un filtre spécifique Cy3. En termes de contrôle négatif, les EB ont été aussi cultivés en présence de capsules sans facteurs de croissance incorporés.

## Résultats

Avant d'utiliser nos capsules pour des tests *in vivo* ou *in vitro*, nous avons voulu savoir si, en leur sein, le film de multicouches était correctement construit avec une bonne incorporation des facteurs de croissance. L'analyse en microbalance à cristal de quartz confirme que le film se construit sans difficulté couche par couche avec une croissance exponentielle et que BMP2 et TGF $\beta$ 1 sont incorporés dans les couches de P $\beta$ L. Ce qui indique le succès de l'encapsulation des protéines chargées négativement au sein de l'architecture du film multicouche. Nous avons utilisé la microscopie confocale à fluorescence pour compléter la caractérisation de nos capsules et afin de déterminer si les films constitués de (P $\beta$ L-P $\beta$ GA)<sub>5</sub>-P $\beta$ L-BMP2-P $\beta$ L-TGF $\beta$ 1-P $\beta$ L étaient homogènes. Les capsules fonctionnalisées fluorescentes de 1  $\mu$ m visualisées en coupe de section verticale possèdent une enveloppe externe qui comprend bien les couches de P $\beta$ L et P $\beta$ GA et les protéines BMP2 et TGF $\beta$ 1 à l'intérieur du film, le trou central correspondant au volume du noyau de silice dissout. La comparaison entre les capsules fonctionnalisées par BMP2 et TGF $\beta$ 1 et les capsules sans facteurs de croissance montre clairement que sans facteurs de croissance, les capsules nanostructurées sont plus fines, ce qui démontre encore une fois une bonne incorporation des protéines.

*In vitro*, nos résultats histologiques indiquent qu'après 21 jours de culture, les capsules fonctionnalisées par à la fois BMP-2 et TGF $\beta$ 1 procurent bien un environnement favorable à la différenciation ostéogénique des cellules souches dérivées des EB. Nous avons pu visualiser en MEB la bonne différenciation des EB en lignée osseuse : ostéocyte, ostéoblaste et os-

téoclaste. Sur les mêmes coupes histologiques, au contact des capsules (P $\beta$ L-P $\beta$ GA)<sub>5</sub>-P $\beta$ L-BMP2-P $\beta$ L-TGF $\beta$ 1-P $\beta$ L, nous avons visualisé des fibres de collagène de type I minéralisées, signe de la production d'une MEC par des cellules osseuses. Mais seules les capsules avec facteurs de croissance BMP-2 et TGF $\beta$ 1 induisent une expression ostéoblastique. En présence de ces capsules fonctionnalisées, on a mis en évidence la présence de larges structures minéralisées en noir par la coloration au von Kossa. Alors qu'avec les capsules de type (P $\beta$ L-P $\beta$ GA)<sub>5</sub>-P $\beta$ L (groupe témoin), aucune différenciation en lignée ostéoblastique des corps embryonnaires n'est constatée. Les capsules témoins non fonctionnalisées n'induisent pas de biominéralisation. Nous avons donc aussi analysé l'expression de l'ostéopontine par immunocytochimie des EB différenciés en lignée ostéoblastique, après croissance en présence des capsules fonctionnalisées. Les EB au contact des capsules avec BMP-2 et TGF $\beta$ 1 expriment l'ostéopontine. Nos deux facteurs de croissance BMP-2 et TGF $\beta$ 1 encapsulés dans les particules de multicouches induisent l'expression spécifique de l'ostéopontine (preuve du bon processus de minéralisation).

*In vivo*, après implantation du biomatériau (capsules fonctionnalisées, gel d'alginate et EB) pendant 4 semaines en sous-cutanée à des souris *nude*, nous avons extrait l'implant et pu regarder l'effet du biomatériau sur la différenciation des EB. Nous avons comparé l'activité du biomatériau fonctionnalisées avec BMP-2 et TGF $\beta$ 1 ou pas (1er groupe témoin), mais aussi l'activité du biomatériau avec ou sans gel d'alginate (2nd groupe témoin). En microscopie optique à grossissement X20, après implantation des EB en présence de gel d'alginate et de capsules de (P $\beta$ L-P $\beta$ GA)<sub>5</sub>-P $\beta$ L-BMP2-P $\beta$ L-TGF $\beta$ 1-P $\beta$ L et coloration avec du bleu de toluidine, nous avons pu individualiser toutes les différentes cellules osseuses : les ostéocytes au sein de leur lacune, les ostéoclastes et les ostéoblastes. Toutes ces lignées cellulaires présentaient un phénotype normal. En revanche, dans le cas où les capsules de (P $\beta$ L-P $\beta$ GA)<sub>5</sub>-P $\beta$ L-BMP2-P $\beta$ L-TGF $\beta$ 1-P $\beta$ L ont été implantées sans gel d'alginate, aucune différenciation en lignées osseuses des cellules issues des EB n'a été constatée. En effet, le gel d'alginate sert de matrice 3D et s'avère nécessaire à la différenciation cellulaire. En MET, il a été observé une ostéoinduction des EB en présence de gel d'alginate et des capsules bioactives. Des ostéoclastes au sein de la matrice extracellulaire, des ostéoblastes, des ostéocytes et des vaisseaux sanguins témoignant d'une induction de la vascularisation osseuse sont bien visualisés. Nous avons pu également en MET, d'une part observer et caractériser des fibres de collagène de type I caractéristique du tissu osseux, d'autre part détecter la présence de cristaux d'hydroxyapatite après différenciation des EB en présence de gel d'alginate et de capsules de (P $\beta$ L-P $\beta$ GA)<sub>5</sub>-P $\beta$ L-BMP2-P $\beta$ L-TGF $\beta$ 1-P $\beta$ L, témoignant d'une ostéoinduction et d'une biominéralisation de la MEC.

## Discussion et perspectives

L'arsenal thérapeutique utilisable en pathologie osseuse s'arme actuellement de greffons osseux, biomatériaux résorbables, facteurs de croissance (10, 11) et de cellules souches autologues (12, 13). Cependant, il persiste des problèmes concernant la régénération osseuse. Nous avons donc essayé dans le cadre de l'ingénierie tissulaire d'associer ces outils et de fonctionnaliser un implant injectable résorbable (capsule avec film de polyélectrolytes) en incorporant des facteurs de croissance osseux, afin de stimuler les processus physiologiques d'ostéof ormation parfois altérés. Nous avons aussi utilisé les propriétés du gel d'alginate comme matrice pour faciliter l'implantation et l'intégration des cellules. Nos résultats suggèrent que la différenciation en lignée osseuse des EB est possible en présence de capsules de multicouches bifonctionnalisées avec des facteurs de croissance osseux. La bonne construction des films de multicouches sous forme de capsules

(autour d'un noyau de silice) a bien été possible. Ensuite, l'incorporation des facteurs de croissance entre deux poly-électrolytes au sein de la multicouche s'est avérée satisfaisante comme le laissent présager d'autres études avec incorporation de protéines dans les multicouches (1, 14). La construction des capsules a été vérifiée et caractérisée avec succès par deux méthodes (7). Après une construction physicochimique concluante, restait à savoir si ces capsules et les facteurs de croissance incorporés allaient avoir une activité biologique d'ostéoinduction. Pour le prouver, nous avons utilisé des corps embryoides mis au contact des capsules bioactives *in vitro* puis *in vivo* et regardé s'il y avait induction de la formation osseuse. Les résultats sont satisfaisants, puisqu'une ostéoinduction (une différenciation en lignée osseuse et une biominéralisation) est constatée *in vitro*. Dans le groupe témoin (capsules sans BMP-2 et TGF- $\beta$ 1), aucune différenciation ou minéralisation n'a eu lieu, confortant bien l'hypothèse que ce sont les facteurs de croissance osseux qui sont responsables de l'action d'ostéoinduction sur les cellules souches et qu'ils sont restés actifs malgré leur incorporation dans le film. BMP-2 et TGF- $\beta$ 1 incorporés dans les multicouches induisent non seulement la différenciation cellulaire mais aussi l'expression de l'ostéopontine, la synthèse de collagène de type I et de cristaux d'hydroxyapatite, marqueurs d'une minéralisation correcte de la MEC et signe que les ostéoblastes obtenus sont actifs. Dans un second temps, les résultats concernant l'activité biologique des capsules fonctionnalisées testées *in vivo* avec des cellules souches embryonnaires implantées dans du gel en sous-cutané sur des souris sont aussi satisfaisants, avec visualisation d'une différenciation en ostéoblastes et obtention d'une biominéralisation de la MEC. Dans le second groupe témoin (capsules avec BMP-2 et TGF- $\beta$ 1 mais implantées sans gel d'alginate), il n'a été constaté aucune différenciation cellulaire ou minéralisation. Le gel s'avère nécessaire comme matrice 3D. L'incorporation des facteurs BMP-2 et TGF- $\beta$ 1 au sein du film de multicouches n'altère pas leur action biologique d'ostéoinduction sur les cellules souches embryonnaires. Les facteurs restent bioactifs *in vivo* au sein de la multicouche. Les résultats de cette étude démontrent que nous sommes en mesure de proposer un biomatériau facile à produire, dégradable, bifonctionnalisé, ostéoinducteur *in vitro* comme *in vivo*. La particularité de notre travail réside dans l'utilisation de capsules bifonctionnalisées et injectables.

D'autres études sur l'animal, notamment dans l'os *in situ*, s'avèrent nécessaires avant d'envisager une implantation chez l'homme. Les problèmes de greffes spongieuses autologues sont bien connus (12), entre la morbidité du prélèvement et la qualité de l'os prélevé. Les cellules souches apparaissent alors comme une source d'os de meilleure qualité. Ainsi, au lieu des cellules embryonnaires (non utilisables chez l'homme à l'heure actuelle pour des raisons éthiques), on pourrait envisager d'utiliser avec nos nanocapsules les cellules souches mésenchymateuses autologues, obtenues à partir soit des adipocytes (15), soit de la moelle osseuse, après centrifugation. On peut extrapoler l'effet produit sur les cellules souches embryonnaires par nos capsules, à l'effet qui serait constaté sur les cellules souches mésenchymateuses autologues, mais n'oublions pas que dans le premier cas elles sont totipotentes (9, 16, 17), alors que dans le second cas elles sont multipotentes (15). Cependant des études cliniques ont déjà démontrées qu'une ostéoinduction était possible à partir de cellules souches et d'un biomatériau résorbable : une ostéof ormation a été obtenue sur des cellules souches issues de la moelle osseuse, mises en culture puis implantées sur de l'hydroxyapatite en extra-osseux (18) ou en intra-osseux sur quatre cas cliniques de pseudarthrose (12). Dans notre étude, le biomatériau est une capsule présentant l'avantage d'être bifonctionnalisée par des facteurs de croissance osseux incorporés, non altérés et bioactifs. Nous pouvons penser qu'il peut y avoir des applications cliniques fructueuses de ces

capsules ostéoinductrices dans les anomalies de la régénération osseuse. Peut-être, qu'en implantant les capsules directement dans l'os spongieux qui ferait office de matrice 3D, on pourrait s'affranchir du gel d'alginate et que les cellules souches mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse pourraient se différencier en ostéoblastes grâce à la libération contrôlée des facteurs de croissance. Enfin, le phénomène d'incorporation de principes actifs dans des films multicouches sur substrat (surface plane) a déjà été décrit pour des protéines et des anti-inflammatoires (19, 20). Des applications cliniques semblent ainsi pouvoir s'étendre à d'autres pathologies de l'appareil locomoteur. On pourrait incorporer dans le film de multicouches de nos capsules, d'autres substances que les facteurs de croissance, comme des médicaments, qui resteraient bioactifs. Il serait intéressant ainsi de tester : des antibiotiques pour éradiquer les infections osseuses, des anti-inflammatoires pour traiter les maladies rhumatismales, des bisphosphonates pour lutter contre l'ostéoporose localisée typiquement au poignet, rachis ou col du fémur, voire des anti-tumoraux pour éviter les récurrences de métastases osseuses.

## Conclusion

Dans le cadre de l'ingénierie osseuse, nous avons réussi à développer un biomatériau injectable, non cytotoxique, nanostructuré et bifonctionnalisé, en utilisant des capsules de multicouches bioactives contenant deux facteurs de croissance osseux, à des fins d'induction de la formation osseuse, *in vitro* comme *in vivo*.

## Questions

### Question D Goutallier

Quel est l'avantage des capsules par rapport aux autres matériaux capables d'apporter des « facteurs » ostéo-inducteurs ?

### Réponse

La taille des capsules permet d'utiliser ce biomatériau fonctionnalisé sous forme injectable. C'est-à-dire qu'il peut être administré par voie percutanée sans avoir besoin d'aborder chirurgicalement le défaut osseux à traiter.

## Références

- Jessel N, Atalar F, Lavalley P, Muterrerr J, Decher G, et al. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv Mater* 2003 ; 15 : 692-95.
- Jessel N, Schwinte P, Donohue R, Lavalley P, Boulmedais F, et al. Pyridylamino-beta-cyclodextrin as a molecular chaperone for lipopolysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Adv Funct Mater* 2004 ; 14 : 963-69.
- Chluba J, Voegel JC, Decher G, Erbacher P, Schaaf P, Ogier J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* 2001 ; 2 : 800-5.
- Dierich A, Le Guen E, Messadeq N, Stoltz JF, Netter P, et al. Bone formation induced by synergy-acting growth factors embedded in the multilayered film. *Adv Mater* 2007 ; 19 : 693-7.
- Caruso F, Caruso RA, Mohwald H. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science* 1998 ; 282 : 1111-4.
- Yu AM, Wang YJ, Barlow E, Caruso F. Mesoporous silica particles as templates for preparing enzyme-loaded biocompatible microcapsules. *Adv Mat* 2005 ; 17 : 1737-41.
- Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C, Messadeq N, Dierich A, et al. Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2010 ; 107 : 3406-11.
- Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 2003 ; 71 : 18-27.



9. Loubet F, Fiszman M. Les cellules souches embryonnaires : un modèle cellulaire pour l'étude de la différenciation cardiaque normale et pathologique. *Médecine/Sciences* 1998 ; 14 : 1072-6.
10. Chen P, Carrington JL, Hammonds RG, Reddi AH. Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2P) and modulation by transforming growth factor B1 and B2. *Exp Cell Res* 1994 ; 195 : 509-15.
11. Oberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor-betas. In: *Peptide growth factors and their receptors*, Sporn MB & Roberts AB (Eds.). Springer Verlag, Heidelberg Germany 1990 : 421-472 pp.
12. Trojani C, Balaguer T, Boukhechba F, Carle GF, Boileau P, Rochet N. Inventaire des stratégies cellulaires en ingénierie tissulaire de reconstruction osseuse. *Rev Chir Orthop* 2008 ; 94 : 1-11.
13. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donova PJ. Longterm proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992 ; 359 : 550-1.
14. Jessel N, Schwinte P, Donohue R, Lavalley P, Boulmedais F, et al. Pyridylamino-beta-cyclodextrin as a molecular chaperone for lipopolysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Adv Funct Mater* 2004 ; 14 : 963-9.
15. Buttery LDK, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JMLDK. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Engineering* 2001 ; 7 : 89-99.
16. Hegert C, Kramer J, Hargus G, Müller J, Guan K, et al. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2002 ; 115 : 4617-28.
17. Dani C. [Stem cells from human adipose tissue: a new tool for pharmacological studies and for clinical applications]. *J Soc Biol* 2006 ; 200 : 45-50.
18. Bareille R, Lafage-Proust MH, Faucheux C, Laroche, Wenz R, et al. Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials* 2000 ; 21 : 1345-52.
19. Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, Lavalley P, Haïkel Y, et al. Multiple and time scheduled in situ DNA delivery mediated by B-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2006 ; 103 : 8618-21.
20. Jessel N, Schwinte P, Falvey P, Darcy R, Haïkel Y, et al. Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Adv Funct Mater* 2004 ; 14 : 174-82.