

UNIVERSITÉ DE LYON

ÉCOLE DOCTORALE MÉCANIQUE – ÉNERGETIQUE - GÉNIE CIVIL - ACOUSTIQUE

LABORATOIRE DE TRIBOLOGIE ET DYNAMIQUE DES SYSTÈMES (UMR CNRS 5513)

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT de l'ÉCOLE CENTRALE DE LYON

Spécialité : Biomécanique

par

Magali CRUEL

Caractérisation et optimisation de l'environnement mécanique tridimensionnel
des cellules souches au sein des bioréacteurs d'ingénierie tissulaire osseuse

Thèse soutenue à l'École Centrale de Lyon le 23 Juin 2015,
devant le jury composé de :

Dr. Hervé PETITE	Université Paris 7	Président du jury
Dr. Joëlle AMÉDÉE	Université de Bordeaux	Rapporteuse
Pr. Patrick CHABRAND	Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Pr. Ridha HAMBLI	Université d'Orléans	Rapporteur
Pr. Katleen VANDAMME	Université Catholique de Leuven	Examinatrice
Dr. Morad BENSIDHOUM	Université Paris 7	Examineur
Pr. Thierry HOC	Ecole Centrale de Lyon	Directeur de thèse

Table des Matières

Introduction	5
Chapitre I Bibliographie.....	9
Introduction	10
1. Le tissu osseux.....	10
1.1 Généralités sur le squelette.....	10
1.2 Fonctions de l'os	11
1.3 Composition chimique	11
1.4 Structure	11
1.4.1 L'os cortical.....	13
1.4.2 L'os trabéculaire.....	14
1.5 Les cellules osseuses et le remodelage osseux	15
1.5.1 Les cellules souches mésenchymateuses	15
1.5.2 Les ostéoblastes	16
1.5.3 Les ostéocytes.....	17
1.5.4 Les ostéoclastes	17
1.5.5 Le remodelage osseux	17
2. La mécanotransduction du tissu osseux	19
2.1 La mécanotransduction à plusieurs échelles.....	19
2.1.1 Echelle macroscopique	19
2.1.2 Echelle microscopique.....	20
2.1.3 Echelle cellulaire	21
2.2 Etudes de la sensibilité des cellules souches mésenchymateuses humaines aux contraintes mécaniques.....	22
2.2.1 Contraintes mécaniques <i>in vivo</i>	22
2.2.2 Réponse au cisaillement de cellules souches mésenchymateuses humaines cultivées en 2D.....	22
3. L'ingénierie tissulaire comme réponse à la problématique des grands défauts osseux	23
3.1 Les grands défauts osseux	23
3.2 Principe général de l'ingénierie tissulaire	25
3.3 Le bioréacteur d'ingénierie tissulaire osseuse et ses composants	26
3.3.1 Les cellules souches mésenchymateuses	26

3.3.2 Le biomatériau	27
3.3.3 L'environnement biologique et mécanique, fourni par le bioréacteur.....	27
3.4 Preuves de concept	28
4. Résultats biologiques dans les bioréacteurs à perfusion	30
4.1 Réponses de cellules souches mésenchymateuses à un stimulus mécanique induit par un flux de milieu de culture	30
4.2 Différences entre les niveaux de stimulation 2D et 3D	31
4.3 Effet des paramètres de culture : flux, viscosité et géométrie du scaffold	32
4.4 Emergence des scaffolds granulaires	33
5. Contraintes mécaniques au sein des bioréacteurs à perfusion	34
5.1 L'évolution des bioréacteurs vers une meilleure stimulation mécanique des cellules	34
5.1.1 Du statique au dynamique	35
5.1.2 Les bioréacteurs dynamiques.....	35
5.2 Nécessité des simulations numériques	36
5.3 Notions de mécanique des fluides	37
5.4 Simulations d'écoulements de milieu de culture au sein des bioréacteurs.....	38
5.5 Distributions des valeurs de cisaillement et généralisation à l'ensemble des scaffolds	40
Conclusion.....	41

Chapitre II Effets comparés de contraintes de compression hydrostatique et de cisaillement sur l'activité des cellules souches mésenchymateuses

humaines	43
Résumé	44
1. Introduction	45
2. Matériels et méthodes.....	49
2.1 Dispositif de compression	49
2.2 Dispositif de cisaillement	50
2.3 Cellules souches mésenchymateuses humaines : extraction et préparation	51
2.4 Expériences de compression et de cisaillement.....	52
2.5 Analyses évaluant la réponse des CSM humaines aux stimuli mécaniques.....	53
2.5.1 Dosage du monoxyde d'azote NO	53
2.5.2 Mesure de l'expression génique par RT-PCR en temps réel.....	53
2.5.3 Mesure de la phosphorylation de ERK1/2 par Western Blot.....	54
2.5.4 Inhibition et activation de ERK1/2 phosphorylé	54
2.6 Analyses statistiques	55
3. Résultats	55

3.1 Calibration des systèmes mécaniques	55
3.2 Effet des stimuli mécaniques sur le relargage de NO.....	56
3.3 Effet des stimuli mécaniques sur l'expression génique.....	58
3.3.1 Expression des gènes à réponse précoce	58
3.3.2 Expression des gènes RUNX2, ALP et HIF1A	60
3.4 Effet des stimuli mécaniques sur la phosphorylation de ERK1/2	60
4. Discussion et conclusion	62

Chapitre III Etude numérique de l'efficacité de scaffolds granulaires pour convertir un flux en stimulation mécanique en ingénierie tissulaire osseuse

.....	67
Résumé	68
1. Introduction	69
2. Matériels et méthodes.....	71
2.1 Génération des empilements granulaires.....	71
2.2 Simulations de dynamique des fluides numériques.....	73
2.3 Analyses des niveaux et distributions du cisaillement	74
2.4 Analyse de l'hétérogénéité	75
2.5 Analyse statistique.....	76
3. Résultats	77
3.1 Vitesse et lignes de courant	77
3.2 Niveaux de cisaillement	78
3.3 Distributions de cisaillement	81
3.4 Analyse de la dispersion locale	81
3.5 Analyse de l'hétérogénéité du cisaillement.....	83
4. Discussion et conclusion	83

Chapitre IV Mise en œuvre expérimentale des résultats numériques : Cultures en bioréacteurs sur différents types d'empilements granulaires .89

Résumé	90
1. Introduction	91
2. Matériels et méthodes.....	93
2.1 Bioréacteur et scaffolds	93
2.2 Préparation et ensemencement des cellules.....	94
2.3 Expériences de flux en bioréacteur	95

2.4 Analyse de l'expression génique.....	96
3. Résultats	96
3.1 Ciblage des gènes activés	96
3.2 Effet du nombre de séquences à flux élevé	98
3.3 Effet de la géométrie et du flux	99
3.4 Comparaison des résultats expérimentaux et numériques.....	100
4. Discussion et conclusion	102
Chapitre V Etude de l'effet du biomatériau sur la réponse des cellules au cisaillement.....	105
Résumé	106
1. Introduction	107
2. Matériels et méthodes.....	109
2.1 Conception et développement d'un dispositif de cisaillement	109
2.2 Préparation des lames et des cellules	111
2.3 Expériences de cisaillement	112
2.4 Analyses de la phosphorylation de ERK1/2 et de l'expression génique	113
3. Résultats	114
3.1 Calibration de la pompe	114
3.2 Croissance cellulaire	115
3.3 Ensemencement des lames de biomatériau	116
3.4 Résultats des analyses de la phosphorylation de ERK1/2	117
3.4.1 Validation du dispositif de cisaillement sur lames de polystyrène.....	117
3.4.2 Phosphorylation de ERK1/2 sur les autres biomatériaux	118
3.4.3 Analyse de l'expression génique en fonction du cisaillement et du biomatériau	119
4. Discussion et conclusion	121
Conclusion et perspectives.....	125
Références bibliographiques	131
Liste des figures	144
Liste des tableaux	146

Introduction

L'ingénierie tissulaire est une très jeune discipline scientifique. Même si l'idée de maintenir des organes en culture *ex vivo* avait été évoquée dans un ouvrage intitulé « The culture of organs » écrit par Alexis Carrel et Charles A. Lindbergh en 1938, la notion d'ingénierie tissulaire en elle-même est apparue au début des années 1980, après un temps nécessaire d'accumulation de connaissances sur les cultures cellulaires et la biologie cellulaire et de développement des biomatériaux. Le principe général de l'ingénierie tissulaire a été établi par R. Langer et J.P. Vacanti dans une publication dans Science intitulée « Tissue Engineering » : développer *in vitro* au sein de bioréacteurs des greffons visant à remplacer partiellement ou entièrement des organes défaillants. Depuis, le développement de cette discipline et la recherche sur ce sujet ont connu une croissance exponentielle, comme en témoigne la figure ci-dessous, qui indique année par année le nombre de publications répertoriées par Web of Science dont le résumé contient les mots « tissue engineering ».

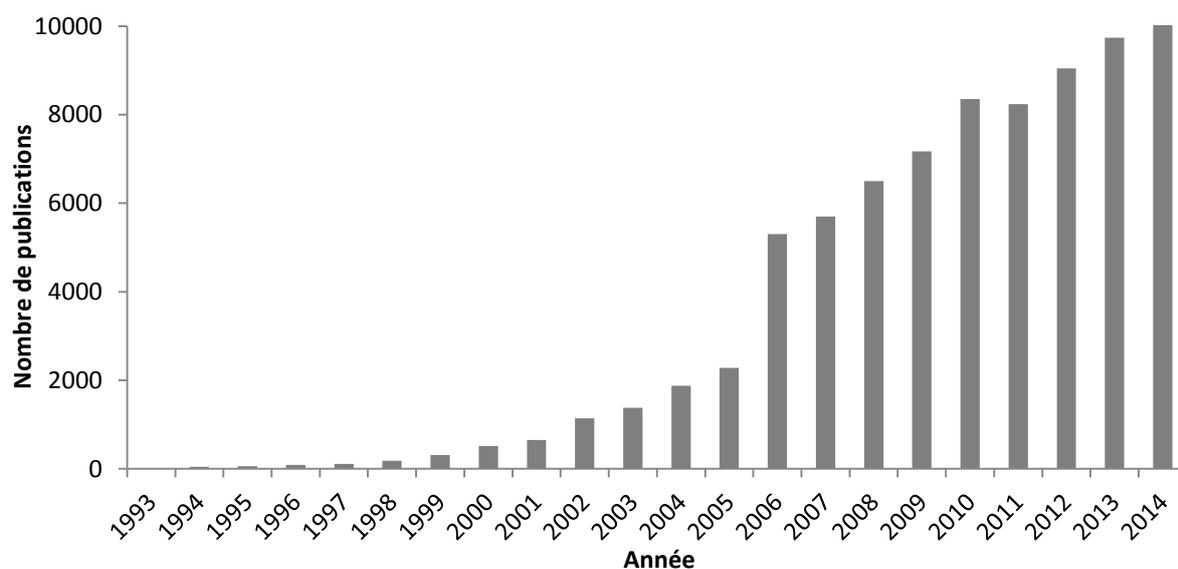


Figure 0 : Nombre de publications répertoriées par Web of Science dont le résumé contient les mots « tissue engineering », année par année.

Cette forte croissance est probablement proportionnelle à l'espoir que suscite la technique, notamment pour pallier le manque d'organes pour des patients en attente d'une transplantation. Cette croissance est et sera entretenue car l'ingénierie tissulaire concerne de plus en plus d'organes, et cela ouvre de nouvelles voies de recherche, y compris dans des domaines annexes nécessaires au développement de l'ingénierie tissulaire.

Le concept de l'ingénierie tissulaire est basé sur une idée à la fois originale et durable : l'utilisation des cellules souches d'un patient pour créer le greffon dont il a besoin. L'implant est composé d'un biomatériau bio-inerte et biodégradable et de cellules autologues et constitue ainsi en quelque sorte l'autogreffe idéale, dans le sens où non seulement la greffe est autologue mais aussi aucun prélèvement, hormis celui des cellules, n'est nécessaire.

Dans le cas de l'ingénierie tissulaire osseuse, les premiers bioréacteurs ont été développés dans les années 1990 en vue de créer des greffons capables de combler des défauts osseux de grande taille. Les greffons sont composés de cellules souches mésenchymateuses,ensemencées sur un biomatériau et cultivées dans un environnement tridimensionnel adapté. L'amélioration progressive des connaissances sur le sujet de la mécanotransduction, processus par lequel les cellules s'adaptent à leur environnement mécanique, a conduit à l'introduction de contraintes mécaniques au cours des cultures d'ingénierie tissulaire. Les cellules osseuses, *in vivo*, sont sensibles aux contraintes mécaniques et s'y adaptent, via le phénomène de remodelage osseux. Cette sensibilité aux contraintes mécaniques représente une opportunité pour l'ingénierie tissulaire osseuse, de créer plus rapidement des greffons plus homogènes et mieux aptes à s'intégrer *in vivo*. Les pistes de recherche sont encore nombreuses dans ce domaine. La connaissance de la biologie cellulaire et du comportement des cellules face à des stimuli externes peut encore progresser. Cela permettra l'optimisation des bioréacteurs en termes de biomatériaux, de stimulation mécanique, de reproductibilité, ... Pour faciliter ces progrès expérimentaux, les simulations numériques sont de plus en plus répandues dans le but

de modéliser les bioréacteurs et de caractériser les contraintes mécaniques appliquées aux cellules, voire même de simuler leur ensemencement, leur consommation de nutriments et leur production de matrice extracellulaire.

Cette thèse aborde le sujet des contraintes mécaniques en ingénierie tissulaire osseuse à la fois du point de vue expérimental et du point de vue numérique. Deux questions ont été le fil conducteur de ce travail de thèse : À quelles sollicitations mécaniques les cellules souches mésenchymateuses humaines sont-elles les plus sensibles ? Comment améliorer les bioréacteurs existants en tirant partie de cette sensibilité ?

Ce document est composé de 5 chapitres.

Le chapitre I est une étude bibliographique qui servira de base de travail aux chapitres suivants. Les sujets traités dans ce chapitre sont : le tissu osseux, la mécanotransduction, l'ingénierie tissulaire osseuse ainsi que les principaux résultats expérimentaux et numériques obtenus au cours du développement des bioréacteurs et de leur optimisation mécanique progressive.

Dans le chapitre II, la réponse de cellules souches mésenchymateuses humaines à des contraintes mécaniques de nature et de niveaux variés a été analysée dans l'objectif d'identifier un stimulus optimal et les voies de signalisations activées par la perception d'un signal mécanique.

Dans le chapitre III, un bioréacteur d'ingénierie tissulaire osseuse à « scaffold » granulaire est étudié numériquement. Le niveau et la distribution du cisaillement sont analysés en fonction du flux d'entrée et de la configuration géométrique du scaffold.

Dans le chapitre IV, une étude expérimentale du bioréacteur modélisé au chapitre précédent est menée. Plusieurs flux d'entrée et plusieurs géométries de scaffold sont aussi testés, et la

réponse des cellules souches mésenchymateuses humaines à ces différents régimes de culture est analysée.

Dans le chapitre V, des cellules souches mésenchymateuses humaines sont cultivées sur différents types de biomatériaux et soumises à une contrainte de cisaillement, dans l'optique d'analyser l'effet de la nature du biomatériau utilisé comme scaffold sur la réponse des cellules aux contraintes mécaniques.

Chapitre I

Bibliographie

Introduction

Le tissu osseux, grâce à sa structure et aux cellules qui le composent, est remarquablement capable de supporter et de s'adapter aux contraintes mécaniques liées à l'activité du quotidien. Cette adaptabilité est permise grâce aux processus de remodelage osseux et de mécanotransduction. Ces deux phénomènes permettent également au tissu osseux de réparer de lui-même des défauts de faible taille. En revanche, des défauts trop importants ne peuvent pas se réparer seuls et d'autres techniques doivent alors être mises en œuvre.

Ce premier chapitre bibliographique décrit dans un premier temps le tissu osseux (§1) et le phénomène de mécanotransduction sur les cellules souches mésenchymateuses humaines (§2). Le principe de l'ingénierie tissulaire ainsi que les premiers résultats obtenus par cette technique sont ensuite abordés (§3). Le §4 décrit les études expérimentales tridimensionnelles en bioréacteurs et les effets mécaniques de différents paramètres. Enfin, les différentes études numériques portant sur le cisaillement au sein de bioréacteurs sont décrites (§5).

1. Le tissu osseux

1.1 Généralités sur le squelette

Chez les vertébrés, le squelette est une charpente interne qui sert de support aux autres organes et donne une forme à l'organisme. Il est constitué d'os et de cartilage. Chez l'être humain, le squelette est composé de 206 os. Ils sont de formes et de structures différentes en fonction de leur localisation dans l'organisme, de leur chargement mécanique et de leur fonction. Il existe des os longs (fémurs, tibias), des os courts (vertèbres), des os plats (scapula) et des os irréguliers (os maxillaire).

1.2 Fonctions de l'os

Les os assurent de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Le squelette sert de charpente et de soutien et donne une forme au corps. Il permet également la protection des organes internes vitaux comme le cœur, les poumons et le cerveau. Avec l'ensemble du système musculo-squelettique, les os permettent également la mobilité et la locomotion. Les os sont une réserve minérale et jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme phosphocalcique. Enfin, dans le canal médullaire, au sein de la moelle osseuse se trouvent les cellules souches hématopoïétiques, à l'origine des cellules sanguines, et les cellules souches mésenchymateuses, à l'origine des cellules osseuses, cartilagineuses, musculaires, etc.

1.3 Composition chimique

Le tissu osseux est un tissu conjonctif, les cellules osseuses sont non jointives et la matrice extracellulaire est prédominante. Cette matrice extracellulaire, solide, est composée d'une matrice organique : microfibrilles de collagène de type I (90%) et protéines, et d'une phase minérale principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$).

1.4 Structure

La majorité des os est composée de deux parties : l'os trabéculaire, dans la partie la plus interne, et l'os cortical, dans la partie externe. L'os trabéculaire est surtout présent dans les épiphyses des os longs, c'est-à-dire aux extrémités. L'os cortical est présent dans tous les os, mais il est le plus épais au niveau des diaphyses des os longs, c'est-à-dire dans la partie médiane. Une illustration de ces différentes parties est présentée figure I-1.

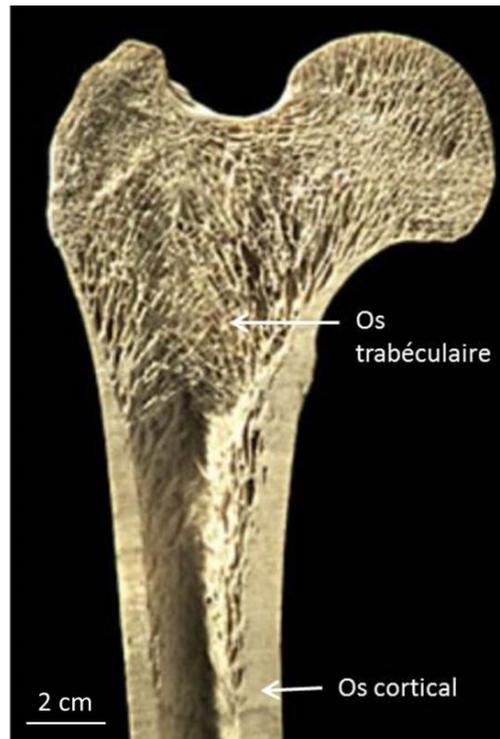


Figure I-1 : Coupe de la partie proximale d'un fémur humain [https://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/structure.html]

Une membrane appelée le périoste entoure l'os cortical, assurant une fonction de vascularisation et d'innervation. Celle-ci joue aussi un rôle fondamental dans le processus de cicatrisation et de réparation osseuse.

Les deux types de tissu, schématisés figure I-2, ont des structures bien différentes.

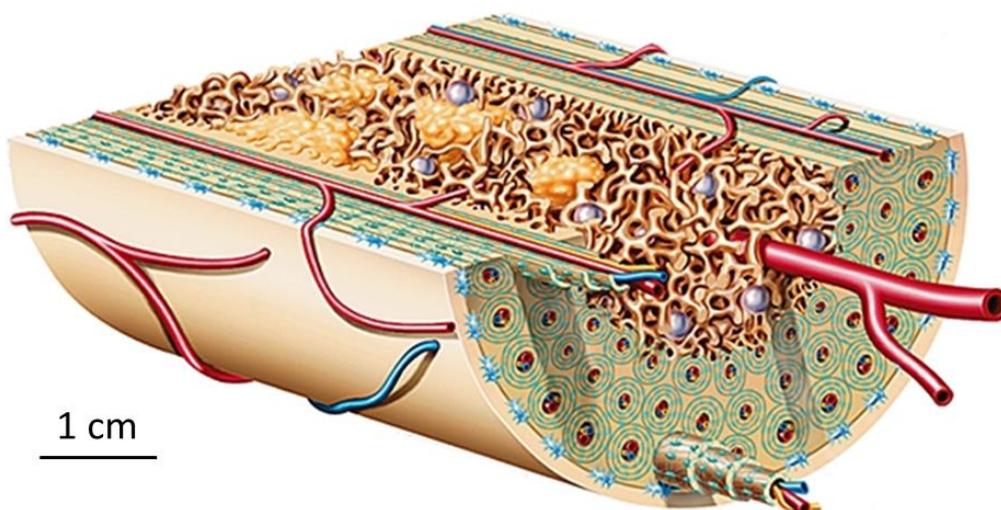


Figure I-2 : Coupe schématique d'un os présentant la structure ostéonale de l'os cortical et la structure spongieuse de l'os trabéculaire [LAR01]

1.4.1. L'os cortical

L'os cortical représente 80% de la masse osseuse chez un adulte humain. Il forme un manchon dense, dur et résistant. Il est organisé en ostéons, structures cylindriques d'environ 300 μm de diamètre. Ils sont composés d'un canal central appelé canal de Havers entouré de lamelles concentriques de matrice extracellulaire (figure I-2). Il présente une faible porosité (10%), qui correspond aux canaux de Havers et de Volkmann (perpendiculaires à la direction de l'ostéon) dans lesquels circulent vaisseaux sanguins et neurones, les canalicules et les lacunes ostéocytaires. Une coupe d'os cortical perpendiculairement à la direction des ostéons est présentée figure I-3.

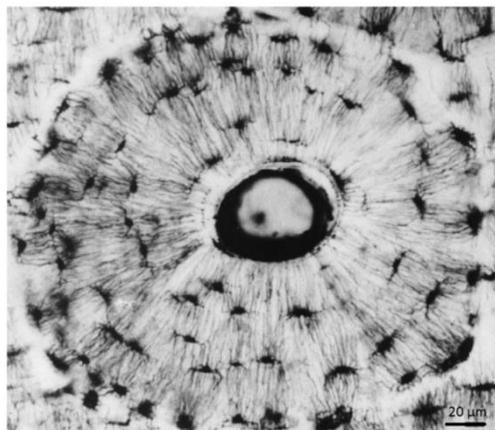


Figure I-3 Photographie au microscope optique d'un ostéon issu d'un échantillon d'os humain [ARD01]. Le canal de Havers est bien visible au centre, ainsi que les lacunes ostéocytaires et les canalicules.

Les fibres de collagène des différentes lamelles ont une orientation différente d'une lamelle à l'autre. A cette échelle sont également visibles les lacunes ostéocytaires au sein de ces lamelles. A l'échelle de la nanostructure, on peut observer les fibres de collagène, principalement de type I, elles-mêmes organisées en fibrilles. Ces fibrilles alignées d'environ 1 nm de diamètre sont constituées de molécules de collagène, entre lesquelles sont intercalées des cristaux d'hydroxyapatite (phase minérale). Les éléments correspondants à ces différentes échelles sont représentés figure I-4.

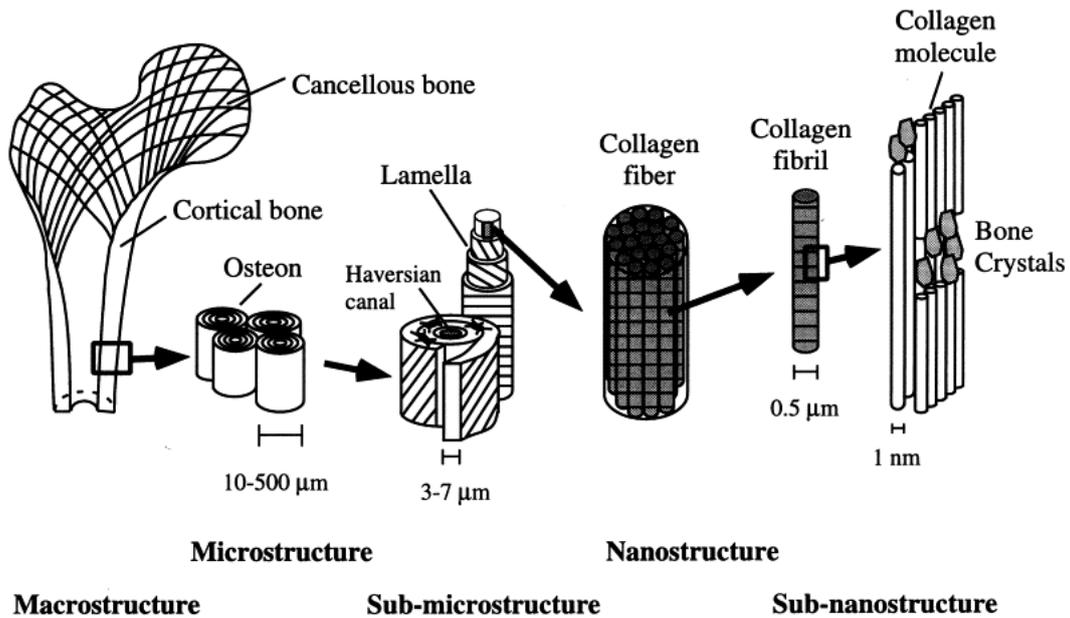


Figure I-4 Organisation hiérarchique de l'os à différentes échelles [RHO98]

1.4.2. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire est un tissu poreux (porosité de 50 à 90 %), constitué de travées osseuses plus ou moins interconnectées entourées par de la moelle et de la graisse (figure I-2). Ces travées sont orientées suivant les directions de plus fortes contraintes mécaniques au sein de l'os (figure I-5). En raison de sa porosité importante, les propriétés mécaniques de l'os trabéculaire sont 10 fois moins élevées que celles de l'os cortical. Cette structure poreuse permet cependant une fonction d'amortissement des chocs mécaniques.

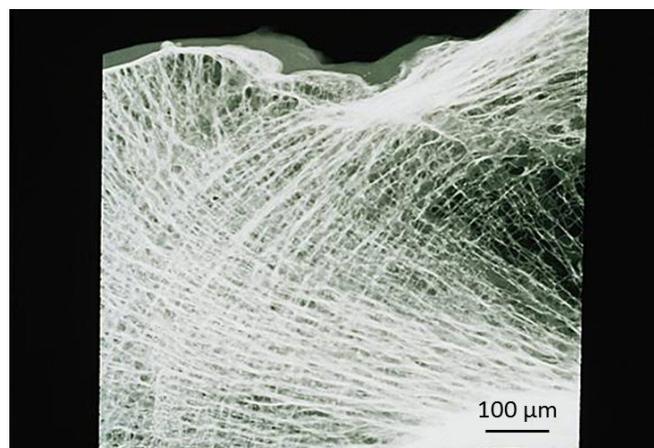


Figure I-5 : Travées osseuses d'os trabéculaire dont la direction est adaptée au chargement mécanique [LAR02]

1.5 Les cellules osseuses et le remodelage osseux

1.5.1 Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules souches adultes immatures et indifférenciées. Elles sont présentes à l'état naturel dans la moelle osseuse ainsi que dans le tissu adipeux [ZUK02]. Elles peuvent être facilement isolées grâce à leur capacité d'adhésion au plastique des boîtes de culture. La figure I-6 montre des CSM humaines en culture dans une flasque de culture. Ce sont des cellules progénitrices qui peuvent notamment se différencier en cellules osseuses (ostéoblastes), cartilagineuses (chondrocytes), graisseuses (adipocytes), musculaires (myoblastes) [CAP91, PRO97]. Ces différentes voies de différenciation, présentées figure I-7, dépendent des stimuli physico-chimiques et des facteurs environnementaux de leur croissance, ainsi que de l'espèce considérée. Par exemple, la différenciation des CSM en ostéoblastes peut être favorisée par l'utilisation de dexaméthasone, BMP-2, vitamine D [JOR04], ou par l'application de cisaillement [DAT06, KRE08, SHA09, ZHA07, LI04]. De plus, les CSM ont une capacité de prolifération très élevée et leur nombre peut être amplifié de manière importante (d'un facteur 10^9) tout en conservant leur multipotentialité et leur capacité de prolifération [PIT99].

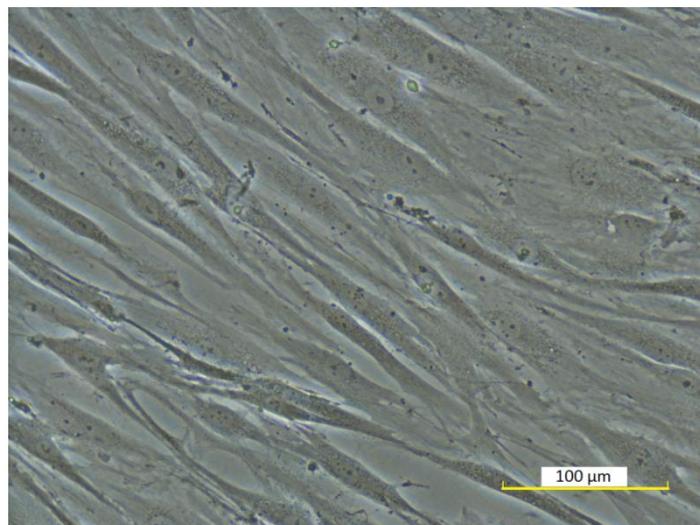


Figure I-6 : Photographie au microscope optique de CSM humaines cultivées au laboratoire

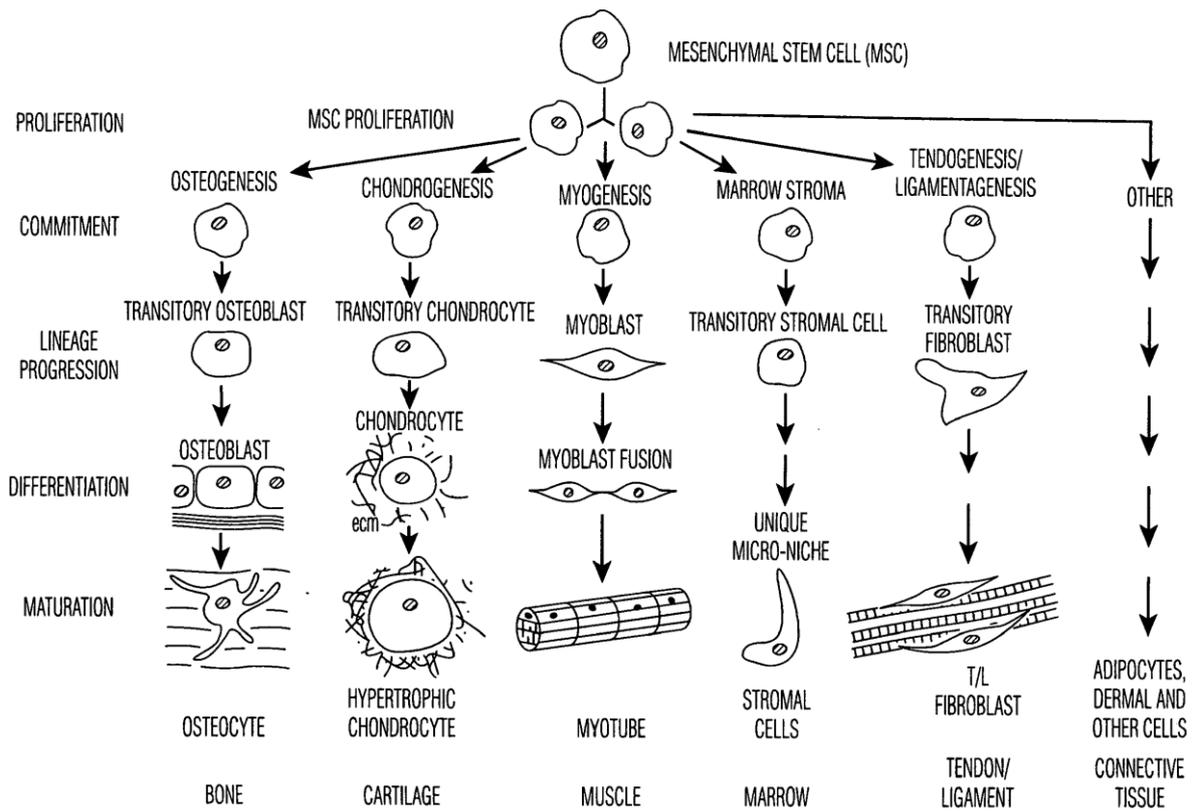


Figure I-7 : Différentes voies de différenciation possibles pour les CSM [CAP94]

1.5.2 Les ostéoblastes

Les ostéoblastes dérivent des CSM. *In vivo* ces cellules se situent à la surface du tissu osseux en formation. Les ostéoblastes ont une fonction de formation de tissu osseux. Chez l'adulte, ils sont recrutés après l'action d'ostéoclastes (résorption d'os) pour combler la cavité de résorption, probablement suite à un message biochimique envoyé par les ostéocytes et par les ostéoclastes en apoptose. Ils apposent d'abord un tissu ostéoïde très peu minéralisé principalement constitué de collagène, de glycoprotéines et de glycosaminoglycanes, puis favorisent la minéralisation de ce tissu en sécrétant notamment des sialoprotéines osseuses et de l'ostéocalcine.

1.5.3 Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes différenciés, qui après la phase de création de matrice osseuse, ont été inclus au sein de cette matrice. Ces cellules se situent dans des cavités au sein du tissu osseux appelées lacunes ostéocytaires. Elles possèdent des prolongements cytoplasmiques qui forment un réseau de communication ostéocyttaire à travers les canalicules de l'os. Ces cellules ont une fonction de maintien de la matrice osseuse et de l'homéostasie de la calcémie et jouent également un rôle fondamental de mécanosenseurs et de signalisation à destination des ostéoclastes et des ostéoblastes.

1.5.4 Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les seules cellules osseuses non issues des CSM mais des cellules souches hématopoïétiques. Elles sont recrutées du système sanguin à l'état de pré-ostéoclastes puis fusionnent pour former des cellules géantes polynucléées qui ont une fonction d'ostéorésorption.

1.5.5 Le remodelage osseux

L'os est un matériau vivant. A travers le processus de remodelage osseux, le tissu osseux est perpétuellement résorbé et reconstruit. Les différentes cellules présentées ci-dessus jouent un rôle actif dans ce renouvellement continu de l'os. Le processus de remodelage osseux est résumé sur la figure I-8. A l'état de repos, la surface osseuse est bordée de cellules inactives. Des ostéocytes sont présents au sein de la matrice. Le phénomène de remodelage osseux intervient généralement après apparition de microfissures. Dans la phase d'activation, des pré-ostéoclastes sont recrutés dans la circulation sanguine et se différencient en ostéoclastes. Ceux-ci se fixent sur la matrice osseuse et résorbe l'os par attaque acide, c'est l'étape de résorption. Les ostéoclastes meurent ensuite par apoptose. Des préostéoblastes sont ensuite

recrutés puis différenciés en ostéoblastes, c'est la phase d'inversion. Dans la phase suivante de formation, les ostéoblastes apposent ensuite un tissu ostéoïde dans le défaut, qui se minéralisera petit à petit. Certains ostéoblastes subissent ensuite une apoptose, d'autres sont intégrées dans la matrice osseuse et se transforment en ostéocytes. Ceux-ci ont ensuite un rôle de mécanosenseurs, via la circulation de fluide interstitiel. Les ostéocytes sont reliés les uns avec les autres via les canalicules en un réseau de communication. Le processus de minéralisation intervient entre 24 et 72 heures après l'apposition. Il est constitué d'une première étape de nucléation des cristaux de phosphate de calcium, suivie d'une phase de croissance cristalline.

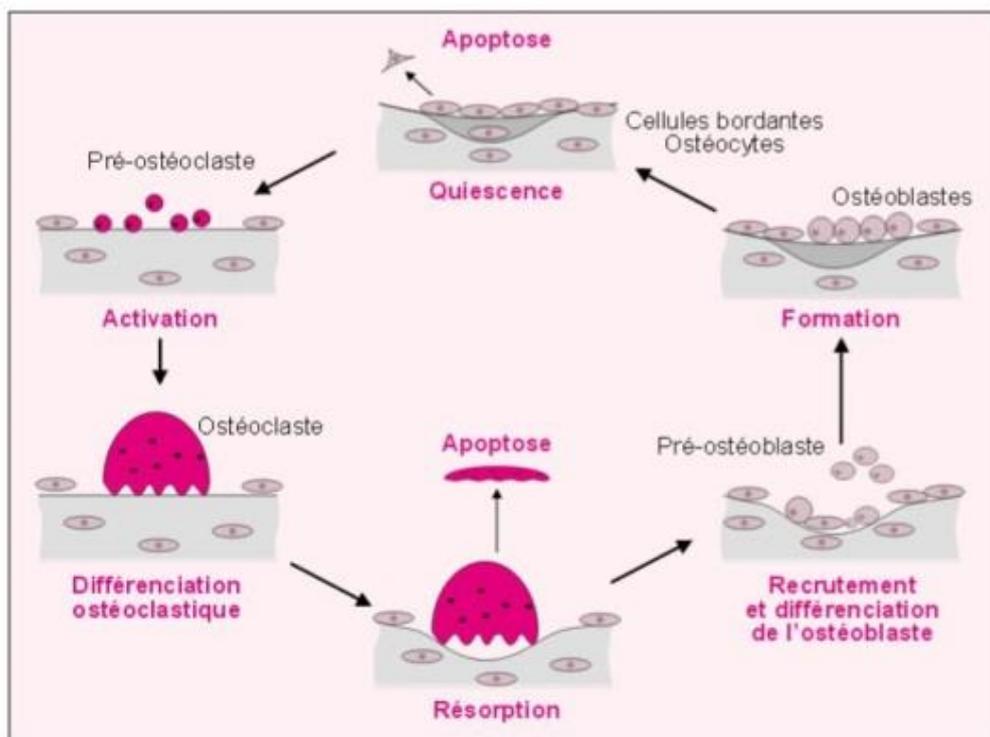


Figure I-8 : Le cycle du remodelage osseux [MAR01]

2. La mécanotransduction du tissu osseux

D'une manière générale, la mécanotransduction est un processus qui permet à un organisme vivant de s'adapter à son environnement mécanique. En ce qui concerne le tissu osseux, la mécanotransduction est le processus par lequel les cellules osseuses détectent les stimuli mécaniques et le convertissent en signaux biochimiques [VAN05]. D'après Duncan *et al.* [DUN95], ce processus peut être divisé en 4 phases distinctes : l'action mécanique, la réaction biochimique, la transmission du signal et la réponse des cellules actrices du remodelage osseux, qui réalisent en conséquence les adaptations nécessaires à l'échelle du tissu.

2.1 La mécanotransduction à plusieurs échelles

2.1.1 *Echelle macroscopique : observations de modification de l'épaisseur du tissu*

L'adaptation de l'os à son environnement mécanique a été évoquée pour la première fois par Wolff en 1892 [WOL92], sous la forme de ce qu'on appelle la loi de Wolff : « L'os d'une personne ou d'un animal sain s'adapte aux chargements mécaniques auxquels il est soumis ». A l'échelle macroscopique, les effets de la mécanotransduction ont été observés depuis les années 1970. Les observations les plus marquantes concernent les astronautes de retour d'un séjour prolongé en apesanteur. La masse et la densité osseuses diminuent fortement, en raison d'une inhibition de la formation osseuse [MOR78]. De tels effets sont également observés à moindre échelle sur des patients alités sur une longue période [ZER98]. Inversement, les sportifs de haut niveau développent une masse osseuse plus importante [BAS94, HAA00]. Ceci est la preuve que les sollicitations mécaniques des cellules osseuses modifient leur

activité, avec des résultats visibles à l'échelle macroscopique. En revanche, les mécanismes de cette mécanotransduction à l'échelle microscopique sont encore en cours d'investigation.

2.1.2 Echelle microscopique : mécanosensation et communication intercellulaire

La mécanotransduction concerne l'ensemble des cellules osseuses. En ce qui concerne la perception d'un chargement mécanique, les ostéocytes semblent être les meilleurs candidats. Ceux-ci sont situés à l'intérieur de la matrice osseuse. Le corps cellulaire se trouve dans une lacune ostéocytaire de la matrice osseuse. Ces cellules présentent également des prolongements dans les canalicules de cette même matrice. C'est via ces canalicules que les cellules sont en contact les unes avec les autres, formant ainsi un réseau tridimensionnel de mécano-perception et de communication [BUR99]. Un chargement mécanique de l'os engendre une circulation du fluide interstitiel dans les canalicules au sein de la matrice osseuse. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les ostéocytes soumis à un chargement mécanique augmentent leur activité métabolique [BON06]. Les ostéocytes établissent ensuite probablement une communication moléculaire, engendrant un recrutement d'ostéoclastes puis une activité de résorption/apposition d'os. Cependant, les mécanismes réels de cette action mécanique transformée en signal moléculaire et cellulaire ne sont encore que partiellement élucidés.

Des études *in vitro* ont également montré des effets des contraintes mécaniques sur les cultures d'ostéoblastes et de CSM, comme détaillé dans la section suivante.

2.1.3 Echelle cellulaire : signaux intracellulaires activés par un stimulus mécanique

Lorsqu'une cellule est soumise à des contraintes mécaniques, une chaîne de réactions biologiques est mise en action. Pour observer ces effets, les cellules sont cultivées *in vitro* en monocouche et soumises à des contraintes mécaniques, le plus souvent de cisaillement. Ces mécanismes de réaction à un stimulus mécanique sont extrêmement nombreux, variés et interdépendants, mais on peut tout de même présenter les phénomènes suivants, observés et décrits dans la littérature :

- Production de monoxyde d'azote (NO) immédiatement après un cisaillement, par les ostéoblastes [SMA97] et les CSM [BAK01, RUB03].
- Production de prostaglandines. Le cisaillement induit par la circulation d'un fluide sur des cellules osseuses induit la production et le relargage de PGE2 *in vitro* [SMA97, BAK01, BAK03]. Les prostaglandines facilitent tous les processus de la formation osseuse lors du chargement mécanique de l'os [VAN05].
- Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'ostéogénèse. On distingue les gènes à réponse précoce (PTGS2, EGR1 et IER3) ; et les gènes à réponse plus tardive (HIF1, VEGF, ITGB1, PTGES, HIF, ALP, OPN) [AJU99, YOU01, DON03]
- Production de certaines protéines MAPK (mitogen-activated protein kinases) : ERK1/2 [YOU01], p38 par des CSM et des ostéoblastes.

2.2 Etudes de la sensibilité des cellules souches mésenchymateuses humaines aux contraintes mécaniques

2.2.1 Contraintes mécaniques in vivo

Le cisaillement induit par la circulation de fluide dans les pores du tissu osseux est considéré comme étant le stimulus mécanique le plus important pour activer les signaux de mécanotransduction et pour arbitrer l'adaptation [DUN95, BUR99], en comparaison par exemple à des contraintes de compression ou à la déformation du substrat.

La question se pose de savoir quelles contraintes mécaniques, et en particulier quelles contraintes de cisaillement, sont ressenties par les cellules *in vivo*, de manière à essayer de reproduire ces niveaux de contraintes *in vitro*. La mesure de ces contraintes étant impossible, il a fallu utiliser la modélisation pour obtenir un ordre de grandeur. Weinbaum *et al.* [WEI94] ont créé un modèle qui a montré que la circulation de fluide physiologique au sein du système lacuno-canaliculaire lors d'une activité physique normale créait un cisaillement compris entre 0.8 et 3 Pa [WEI94].

2.2.2 Réponse au cisaillement de cellules souches mésenchymateuses humaines cultivées en 2D

Pour observer les effets des contraintes mécaniques de manière précise et contrôlée, les cellules sont généralement cultivées en monocouche sur des lames montées en chambre à flux parallèle. Il a été montré lors de ce type d'études que les contraintes de cisaillement régulent l'activité cellulaire. La stimulation mécanique de cisaillement créée par le flux a augmenté la quantité de nombreuses molécules « signal » (ions calcium), de facteurs paracrines (prostaglandine E2, PGE2) et l'ARN messenger de protéines de la matrice osseuse (ostéopontine), comme en témoigne le tableau I-1.

Référence	Stimulation	Temps	Effet observé
Klein-Nulend <i>et al.</i> [KLE98]	Cisaillement pulsatile 0.7 Pa, 5 Hz	1h	Augmentation de la production de NO et de l'expression de eNOS
Li <i>et al.</i> [LI04]	Cisaillement oscillant, 1 Pa, 1 Hz	2h	Augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, de la prolifération cellulaire et de l'expression des gènes ostéopontine et ostéocalcine
Grellier <i>et al.</i> [GRE09]	Cisaillement continu 1.2 Pa	30 min 90 min	Augmentation de l'expression du gène ALP Diminution de l'expression du gène Coll Pas de modification de l'expression des gènes Cbfa1/Runx2 Phosphorylation de ERK1/2 et p38
Yi <i>et al.</i> [YI10]	Cisaillement continu 0.3 Pa	6h	Augmentation de l'expression des protéines AnnexinA2 et GAPDH

Tableau I-1 : Etudes sur les effets du cisaillement sur CSM humaines en 2D en fonction du niveau et de la durée de stimulation.

On constate grâce à ce tableau que même en considérant une seule espèce et un seul type cellulaire, on observe des effets des contraintes mécaniques très différents en fonction notamment du type de stimulation, du temps de stimulation et du support de culture.

3. L'ingénierie tissulaire comme réponse à la problématique des grands défauts osseux

3.1 Les grands défauts osseux

Lorsqu'un défaut osseux de petite taille apparaît au sein du tissu osseux, celui-ci est réparé naturellement et automatiquement par l'organisme. Cette réparation se passe en trois phases : inflammation, réparation et remodelage. Lors de la phase inflammatoire, un caillot de sang se forme et des cellules phagocytaires interviennent pour éliminer les débris. Ensuite, des ostéoblastes recrutés du périoste recouvrent le caillot puis des CSM migrent vers la fracture. Si celle-ci est stabilisée, ils se différencient en ostéoblastes, sinon en chondrocytes pour produire un lien provisoire entre les deux parties. Tout se passe ensuite comme au cours de

l'embryogénèse, il y a formation d'os tissé, petit à petit résorbé et remplacé par de l'os lamellaire.

Lorsqu'un défaut osseux est de taille trop élevée, il n'y a pas de réparation. Ces défauts peuvent apparaître lors d'un traumatisme, ou bien consécutivement à un curetage pour enlever une tumeur ou un kyste. Dans ce cas, il y a nécessité d'intervention humaine pour combler le défaut. Le nombre annuel de greffes osseuses dans le monde s'élève à plus de 2 millions, faisant de l'os le deuxième tissu le plus transplanté après le sang. Actuellement, le traitement le plus utilisé dans ce cas-là est l'autogreffe. Un morceau d'os est prélevé, le plus souvent au niveau de la crête iliaque de l'os du bassin, puis réimplanté au niveau du défaut. Cela permet le comblement du défaut en prélevant du tissu à un endroit où le chargement mécanique est faible. Une telle greffe présente tous les éléments nécessaires à une bonne réparation osseuse : une matrice minéralisée et des cellules ostéocompétentes. Cette technique présente l'avantage évident d'éviter tout risque de rejet par le caractère autologue de la greffe. De plus, le greffon a des propriétés d'ostéoconduction, d'ostéoinduction et même d'ostéogénicité. L'ostéoconduction est la propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur au contact de ce matériau. L'ostéoinduction est la propriété d'un matériau qui contient des protéines de la morphogénèse osseuse (BMPs) et dont la libération va induire le recrutement local de CSM indifférenciées et provoquer leur différenciation en ostéoblastes capables de synthétiser une matrice osseuse minéralisable. L'ostéogénicité est la propriété d'un matériau contenant des cellules ostéocompétentes capables de synthétiser un tissu osseux. L'autogreffe est considérée comme le matériau de référence en matière de substitution osseuse.

Ce traitement présente toutefois des inconvénients majeurs, qui motivent des recherches de techniques alternatives. En effet, la chirurgie est double donc plus longue, plus complexe et

plus risquée. De plus, le nombre de sites où il est possible de prélever de l'os sans perte de fonctionnalité est limité et il est compliqué de faire une greffe efficace dans le cas d'un défaut à forme irrégulière. Enfin, les complications post-opératoires sont assez fréquentes (10% des cas) : infections, fractures, douleur, paresthésie, dommage nerveux et morbidité du site donneur [MIS05].

A défaut de pouvoir réaliser une autogreffe, le chirurgien peut utiliser de l'os de banque décellularisé ou des matériaux ostéoconducteurs, qui ne servent alors que de support passif à la néoformation osseuse et possèdent un potentiel ostéogène limité.

Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire peut être considérée comme une alternative prometteuse, permettant la création de matériaux ostéogènes à partir de biomatériaux ostéoconducteurs et de cellules ostéocompétentes.

3.2 Principe général de l'ingénierie tissulaire

La définition générale de l'ingénierie tissulaire a été formulée par Langer et Vacanti en 1993 [LAN93]. C'est un « domaine interdisciplinaire qui applique des principes d'ingénierie et des sciences de la vie en vue de développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer la fonction d'un organe ». Le principe est d'utiliser des cellules souches d'un patient, de les cultiver *in vitro* dans des conditions adéquates sur le plan de l'environnement tridimensionnel (support de la culture, apport en nutriments et en oxygène, évacuation des déchets et éventuellement sollicitations mécaniques et électriques) pour en former un greffon de dimension, de composition et de structure maîtrisées, que l'on peut alors réimplanter sans risque de rejet. La majeure partie de ces cultures se déroulent dans un bioréacteur, dispositif qui permet le contrôle des paramètres environnementaux cités ci-

dessus. Un schéma de principe de l'ingénierie tissulaire osseuse est présenté figure I-9 ci-dessous.

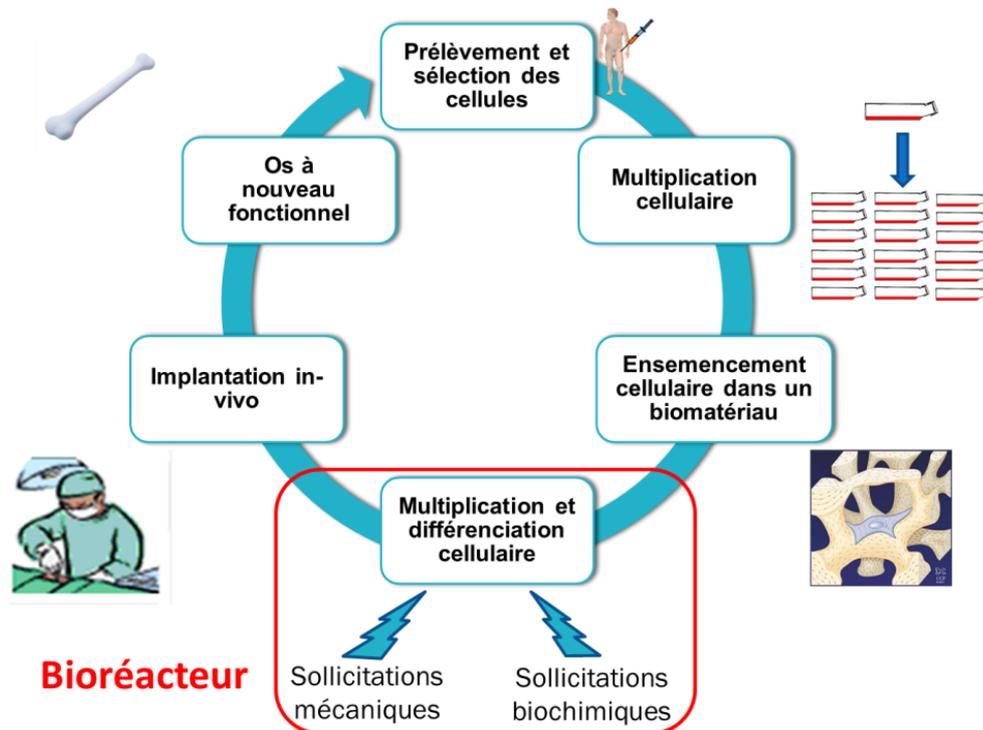


Figure I-9 : Schéma de principe de l'ingénierie tissulaire osseuse et de ses différentes étapes

Dans le cas de l'ingénierie tissulaire osseuse, on place dans le bioréacteur les CSM ensemencées sur un biomatériau « scaffold » et en présence de milieu de culture en circulation. La nature et la fonction de ces constituants sont détaillées dans les sections suivantes.

3.3 Le bioréacteur d'ingénierie tissulaire osseuse et ses composants

3.3.1 Les cellules souches mésenchymateuses

Grâce à leur capacité élevée de prolifération et d'autorenouvellement, et à leur possibilité de se différencier en cellules osseuses, les CSM sont les meilleures candidates pour l'ingénierie

tissulaire de l'os [TIT10]. Elles apportent une excellente capacité de régénération comparées à des cellules déjà partiellement ou totalement différenciées. Elles présentent de plus l'avantage d'être assez faciles d'accès et faciles à isoler, en prélevant de la moelle par ponction (crête iliaque ou sternum), sur des résidus de tête de fémur issus d'opérations de la hanche, ou encore en prélevant du tissu adipeux par liposuction. La moelle osseuse peut être mise en culture directement et les CSM, seules cellules adhérentes au plastique des boîtes de cultures, peuvent être isolées.

3.3.2 Le biomatériau

Différents biomatériaux sont utilisés dans la littérature comme support des cultures d'ingénierie tissulaire osseuse, appelé « scaffold » :

- Des céramiques d'origine synthétiques : hydroxyapatite pure [BOY99] ou hydroxyapatite et triphosphate de calcium [JAN06]
- Du corail [PET00, DAV11]
- Des polymères, avec ou sans insertion de cristaux de céramique : acide polylactique [LIA01, MON08, ORR08]
- De l'os de banque ou décellularisé [GRA08]
- De la soie [MEI05]

Ces biomatériaux présentent chacun des propriétés et des avantages différents, mais ils sont tous biodégradables et poreux, certains naturellement, d'autres grâce à leur procédé de fabrication.

3.3.3 L'environnement biologique et mécanique, fourni par le bioréacteur

Le bioréacteur est le dispositif qui donne aux cellules l'environnement tridimensionnel biochimique et mécanique nécessaire à leur bon développement. Il est nécessairement rempli

de milieu de culture pour fournir aux cellules nutriments et oxygène. Ce milieu de culture est souvent en circulation par rapport au scaffold sur lequel se trouvent les cellules, cela permet de nourrir les cellules, d'éliminer les déchets biologiques mais aussi, comme cela sera détaillé par la suite, d'apporter aux cellules une stimulation mécanique.

3.4 Preuves de concept

La première preuve de ce concept dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse a été établie en 2000 sur un modèle de « gros animal » par Petite *et al.* [PET00]. Dans ce travail, des défauts osseux ont été créés sur des métatarsiens de brebis, puis comblés par trois différents matériaux : du corail seul, du corail mélangé à de la moelle osseuse fraîche et du corail préalablementensemencé avec des CSM de brebis. Le corail est utilisé sous forme de particules dont l'ensemble forme le scaffold. Après 16 semaines, les analyses par microtomographie et coupes histologiques ont établi que la seule méthode de comblement qui a résulté en une réparation osseuse et une restauration de la continuité corticale était celles des cellules souchesensemencées sur le corail, comme en témoignent les figures I-10 et I-11 ci-dessous.

Dans une autre étude, des résultats positifs de minéralisation et d'ostéogénèse ont été obtenus avec des CSM de chèvresensemencées sur des granules d'hydroxyapatite/triphosphate de calcium après une implantation en sous-cutané chez la souris « nude » [JAN06].

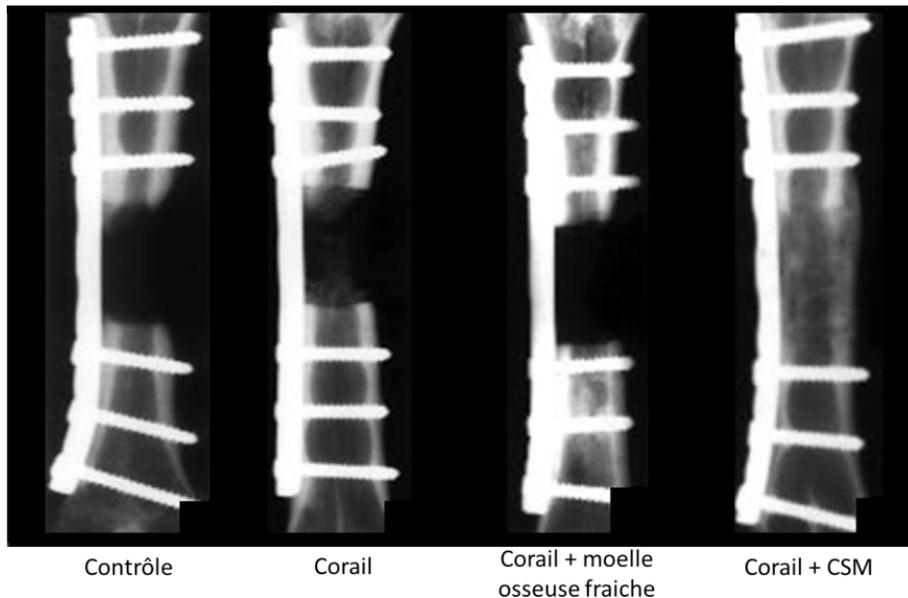


Figure I-10 : Images radiographiques des métatarsiens de brebis, 16 semaines après la résection et l'implantation ou non d'un matériau de comblement [PET00].

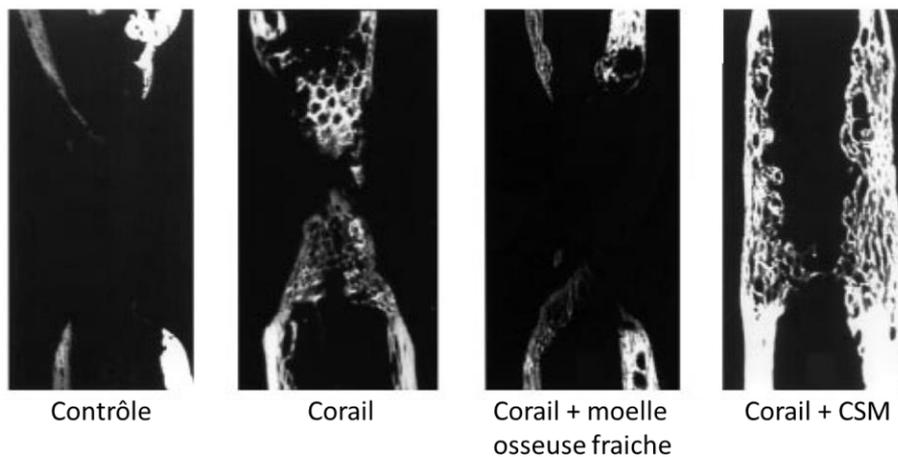


Figure I-11 : Coupes obtenues au microscanner des métatarsiens de brebis, 16 semaines après la résection et l'implantation ou non d'un matériau de comblement [PET00].

En 2007, Marcacci *et al.* [MAR07] ont même rapporté de très bons résultats sur quatre patients humains, dont les défauts osseux ont été comblés avec leurs CSM issues d'une ponction au niveau de la crête iliaque,ensemencées sur des cylindres de céramique poreux de la taille du défaut. Trois de ces patients ont été suivis en postopératoire pendant plus de 6 ans, montrant l'efficacité de cette méthode de traitement à long terme. Une étude angiogénique réalisée sur un des patients a même montré une excellente restauration de la vascularisation de la zone traitée.

4. Résultats biologiques dans les bioréacteurs à perfusion

4.1 Réponses de cellules souches mésenchymateuses à un stimulus mécanique induit par un flux de milieu de culture

Il a été montré que des CSM de rat ou de sourisensemencées dans un environnement tridimensionnel répondent positivement à une stimulation mécanique [BAN02, CAR03, SIK03, DAT05, HOL05, VAN11]. Ceci s'est traduit par la « promotion » de la prolifération cellulaire, de la différenciation cellulaire (surexpression des gènes RunX2, ostéocalcine, ALP) et de la production de matrice extracellulaire. Les niveaux estimés de cisaillements correspondant à ces résultats positifs sont de 0.005 à 2.5 Pa [MAE09, STO09].

L'effet du flux au sein d'un bioréacteur sur des CSM humaines a été étudié par Zhao *et al.* [ZHA07] et Correia *et al.* [COR13]. Dans le premier cas, les CSM,ensemencées sur une matrice poreuse en polymère, ont répondu positivement à de très faibles flux créant des cisaillements compris entre 10^{-5} et 10^{-4} Pa [ZHA07]. Cela s'est traduit par une augmentation du nombre de cellules, de la quantité de protéines produites, de l'activité de l'alcaline phosphatase et de la déposition de calcium, par rapport à un contrôle statique. Dans le second cas, les CSM,ensemencées sur un scaffold de soie, ont répondu positivement à des flux créant des cisaillements de 5 à 15 mPa. Cela s'est traduit par une augmentation de l'expression des gènes ostéopontine, BSP (bone sialoprotein) et PTGS2 ainsi que de la minéralisation.

En revanche, des niveaux délétères de cisaillement ont été rapportés pour des cultures 3D au sein de scaffolds poreux, entre 2.6 et 5.4 Pa [CAR03, ALV07]. Les flux à l'origine de tels cisaillements ont engendrés la mort et/ou le décollement des cellules. A partir de ce constat, Vance *et al.* [VAN05] proposent d'utiliser un flux faible pour maintenir la viabilité cellulaire tout en interposant de brefs accès de stimulation mécanique (flux oscillant correspondant à un

stimulus mécanique physiologique, 30min/jour pendant 2 jours à environ 1.2 Pa) pour augmenter la production de PGE2. Cette idée a été testée sur des CSM de souris ensemencées sur des scaffolds de phosphate de calcium. Il a été observé une augmentation significative de la quantité de PGE2 entre le cas du flux faible seul par rapport aux conditions statiques, ainsi qu'une augmentation significative de la quantité de PGE2 entre le cas de la stimulation et le cas du flux faible seul en continu.

4.2 Différences entre les niveaux de stimulation 2D et 3D

Les expériences bidimensionnelles et tridimensionnelles présentent de grandes différences dans les valeurs de cisaillement auxquelles les cellules répondent positivement. Par exemple, des cellules ostéoblastiques cultivées en 2D ne produisent pas de PGE2 avec un cisaillement de 30 mPa [SMA97] alors qu'en 3D, elles en produisent avec des cisaillements de 1 mPa [JAA08]. Les raisons de ces différences sont multiples. Même si elles ne sont pas entièrement élucidées, quelques hypothèses peuvent déjà être avancées.

D'une part, la nature du scaffold joue un rôle. Lors des expériences bidimensionnelles, les cellules sont ensemencées en monocouche sur des lames de verre ou de polystyrène. Hors dans les environnements tridimensionnels des bioréacteurs, les cellules sont ensemencées sur des scaffolds de corail, de phosphate de calcium synthétique ou de PLLA (acide polylactique). Une différence de matériau est à la fois une différence chimique, une différence topographique mais aussi une différence mécanique (dureté). Cela engendre nécessairement des différences de réponses cellulaires [DEL01, SIK01].

D'autre part, les conformations spatiales adoptées par les cellules sont évidemment différentes dans un environnement 3D par rapport à une culture en monocouche 2D. Les scaffolds

poreux, formant des enceintes quasi-sphériques autour des cellules, donnent la possibilité à celles-ci de former des « ponts » (bridges) allant d'une paroi à l'autre, plutôt que de s'ensemencer « à plat » (flat) sur les parois du biomatériau, comme c'est nécessairement le cas en 2D. Il a été constaté que les cellules se mettent préférentiellement en conformation « bridge » dans un scaffold poreux [JUN09^a, MCC10, MCC12]. L'hypothèse peut être faite que des cellules en configuration « bridge » subiraient des niveaux de déformation bien plus élevés que des cellules ensemencées à plat, du fait de leur position perpendiculaire au flux. De plus, les points focaux d'adhésion d'une cellule en conformation 3D ne sont pas les mêmes que les adhérences d'une cellule ensemencée à plat sur leur substrat [CUK01, GRI06]. Les signaux de communication intra- et intercellulaire peuvent aussi être modifiés. Ainsi ces cellules ne peuvent pas subir en 3D des cisaillements élevés comme ceux pratiqués lors des expériences en monocouches, mais en revanche elles répondent positivement à des flux très faibles.

4.3 Effet des paramètres de culture : flux, viscosité et géométrie du scaffold

Toutes les études ayant testé des flux différents au sein des bioréacteurs rapportent des effets bénéfiques du flux par rapport à une condition statique, et d'un flux plus élevé par rapport à un flux plus faible [GRA08, BAN02, SIK03, MCC12], jusqu'à un certain seuil où celui-ci devient délétère [CAR03].

Une augmentation du flux à viscosité constante (en gardant le même milieu de culture), augmente nécessairement le transport de masse et les échanges nutriments/déchets, ce qui peut être la cause des effets positifs sur la prolifération et la minéralisation. Pour vérifier ce point, Sikavitsas *et al.* [SIK03] ont mis au point des expériences à flux constant (transport de

masse constant) et à viscosité différente (cisaillement différent) en ajoutant au milieu une substance plus visqueuse mais inerte biologiquement parlant. Cette étude a révélé que c'était bien le stimulus mécanique de cisaillement qui avait des effets positifs sur l'activité des cellules.

D'autres études se sont portées sur l'influence de la géométrie des pores ou de la géométrie des scaffolds utilisés. Les résultats montrent une forte dépendance du cisaillement et donc de la réponse cellulaire à la distribution des pores [OLI09], la forme du scaffold [GUT08], la porosité et la taille des pores [MCC12, MAS06, VOR10^a] et même la courbure des pores [RUM08].

4.4 Emergence des scaffolds granulaires

Des scaffolds massifs et poreux ont été développés en premier lieu. Avant la culture, une première étape de perfusion avec une suspension cellulaire est nécessaire pour ensemercer le biomatériau. Puis pendant la culture, le biomatériau doit être perfusé avec du milieu de culture pour alimenter les cellules en nutriments et évacuer leurs déchets. Mais ces deux étapes ne sont pas aisées. Rien ne garantit une densité surfacique homogène de cellules avec cette méthode d'ensemencement. De plus, au cours de la culture, il se peut que le fluide circule difficilement, le transport de masse se faisant alors moins bien, voire plus du tout au fur et à mesure que les cellules produisent de la matrice extracellulaire.

Dans ce contexte, un nouveau type de scaffold a commencé à être utilisé et étudié depuis 2006 : les scaffolds granulaires, parfois aussi appelés scaffolds modulaires. Il s'agit d'utiliser des particules de biomatériaux, de taille millimétrique, dont l'empilement forme un scaffold. L'ensemencement est facilité puisqu'il peut être réalisé au préalable de la culture en

bioréacteur sans nécessiter une perfusion à travers des pores étroits. De plus, ce type de scaffolds présente l'avantage de pouvoir être modulé. Grâce à leur caractère granulaire, il est possible de combler des défauts de n'importe quelle forme et taille, sans avoir un besoin préalable de concevoir une géométrie précise du biomatériau.

Ces nouvelles géométries de scaffolds ont déjà été utilisées avec l'ensemble des biomatériaux habituellement utilisés en ingénierie tissulaire osseuse : céramique synthétique [JAN06], corail [DAV11, VIA07], polymère [ORR08, YEA11^a]. Lors d'études d'implantation *in vivo*, de bons résultats ont été obtenus en termes de minéralisation et d'ostéointégration [JAN06, VIA07].

5. Contraintes mécaniques au sein des bioréacteurs à perfusion

5.1 L'évolution des bioréacteurs vers une meilleure stimulation mécanique des cellules

Dans l'histoire de l'ingénierie tissulaire osseuse, la prise en compte des facteurs de mécanotransduction est très récente. La simple association de cellules avec un biomatériau permet certes le comblement du défaut mais présente de faibles propriétés ostéogénitrices. Dans l'objectif d'obtenir des greffons plus homogènes dans de meilleurs délais, où les cellules sont correctement stimulées pour la prolifération et pour la différenciation, et pour se rapprocher des conditions environnementales réellement connues par les cellules *in vivo*, les contraintes mécaniques sont devenues des éléments de plus en plus importants du cahier des charges des bioréacteurs d'ingénierie tissulaire osseuse.

5.1.1 *Du statique au dynamique*

Dans les cultures tridimensionnelles statiques, il a été observé que les cellules se concentraient à la périphérie des scaffolds poreux, ce qui a pour conséquence de limiter drastiquement les échanges de nutriments et de déchets au milieu du scaffold [GOL01]. Dès lors, une importante apoptose cellulaire est observée au centre des scaffolds. Ainsi, le développement de bioréacteurs dynamiques est apparu comme l'alternative pour améliorer les échanges de nutriments et de déchets, et favoriser la croissance cellulaire [GLO98, GOL01].

5.1.2 *Les bioréacteurs dynamiques*

Plusieurs types de bioréacteurs dynamiques ont été expérimentés : les bioréacteurs à parois rotatives, les bioréacteurs « spinner flasks », les bioréacteurs à compression et enfin les bioréacteurs à perfusion [VET13]. Les premiers bioréacteurs dynamiques ont été conçus uniquement pour pallier le problème d'échange de nutriments et de déchets [BAN02], ceux-ci n'étaient donc pas conçus en vue de stimuler les cellules mécaniquement.

Ce n'est qu'assez récemment que la mécanotransduction a été prise en compte dans les processus de conception et de développement des nouveaux bioréacteurs. Dans ce contexte, ce sont les bioréacteurs à perfusion qui se sont largement imposés. Le principe est le suivant : les cellules sontensemencées à la surface d'un biomatériau poreux, et le tout est perfusé par du milieu de culture. Celui-ci passe à travers le scaffold, et dans tous les pores, assurant ainsi la fonction de transport de masse et appliquant un cisaillement induit par le flux au niveau des cellules. Les contraintes mécaniques de cisaillement sont celles sur lesquelles l'accent a été mis en raison de bon résultats obtenus *in vitro* en cultures 2D [GAS12, HUN13].

En plus des fonctions de transport et de mécanostimulation, les bioréacteurs dynamiques pourraient aussi permettre de réduire les temps de culture et d'améliorer les propriétés mécaniques des greffons [VAN05].

5.2 Nécessité des simulations numériques

La connaissance des contraintes mécaniques présentes au sein des bioréacteurs existants est fondamentale à la compréhension des effets du flux sur les cellules ainsi qu'à l'optimisation de ces bioréacteurs du point de vue de la stimulation mécanique. Tout d'abord, il est à noter que le cisaillement aux parois des scaffolds n'est pas une grandeur mesurable. Il est donc nécessaire de le calculer, en fonction de la géométrie du scaffold et du flux. Ce calcul ne peut être réalisé de manière analytique que dans des cas standards extrêmement simples. Goldstein *et al.* [GOL01] ont créé un modèle, basé sur l'hypothèse de pores cylindriques, qui permet d'approximer le cisaillement dans des structures poreuses perfusées :

$$\tau = \frac{8\mu V}{d} \quad \text{Eq. I-1}$$

Où τ est le cisaillement moyen aux parois, μ est la viscosité dynamique du fluide, V est la vitesse moyenne du fluide dans un pore et d le diamètre moyen d'un pore. Il a été montré que cette méthode permet d'obtenir un ordre de grandeur mais surestime le cisaillement moyen dans un bioréacteur [JUN09^b].

Dans le cas de structures tridimensionnelles complexes où le cisaillement n'est pas du tout homogène, variant d'un bioréacteur à un autre ou d'un scaffold à un autre, des simulations numériques doivent être réalisées. Seuls ces calculs pourront permettre de déterminer les niveaux de cisaillements locaux en tout point du scaffold, mais également ensuite grâce à un

traitement post-simulation la moyenne et la distribution de ce cisaillement. Une complexité supplémentaire est ajoutée lorsque l'on souhaite en plus prendre en compte dans le calcul l'expansion cellulaire et la création de nouvelle matrice extracellulaire, revenant à une géométrie variable au cours du temps [POR07]. La viscosité du milieu peut également évoluer dans le temps au fur et à mesure des sécrétions des cellules, comme les prostaglandines par exemple [SAN08]. On peut cependant au moins dans un premier temps faire l'hypothèse que la présence des cellules n'affecte pas le flux, approximation qui est estimée valable pour au moins une semaine de culture par Voronov *et al.* [VOR10^a].

5.3 Notions de mécanique des fluides

Avant de réaliser une simulation, il est nécessaire de comprendre la mécanique de l'écoulement du fluide au sein du bioréacteur. Dans notre cas, nous nous intéressons à l'écoulement d'un fluide homogène, incompressible, visqueux et newtonien. Un tel fluide a une masse volumique ρ constante. La loi de comportement d'un tel fluide est la suivante :

$$\sigma = \mu(\nabla\vec{v} + (\nabla\vec{v})^T) - pI \quad \text{Eq. I-2}$$

où σ est le tenseur de contraintes de Cauchy, μ est la viscosité dynamique du fluide, \vec{v} est le vecteur vitesse et p est la pression. L'écoulement de ce type de fluide est régi par les équations de Navier-Stokes stationnaires :

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} - \mu \nabla^2 \vec{v} + \rho(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} + \overline{\nabla p} = \vec{F} \quad \text{Eq. I-3}$$

$$\nabla \vec{v} = 0 \quad \text{Eq. I-4}$$

5.4 Simulations d'écoulements de milieu de culture au sein des bioréacteurs

Les hypothèses suivantes sont généralement adoptées lors des simulations. Le scaffold n'est ni déformable, ni affecté par le flux. Le cisaillement ressenti par les cellules, exercé à la surface de leur membrane, est le cisaillement aux parois de leur substrat. La viscosité d'un milieu de culture supplémenté en sérum de veau fœtal est de l'ordre de 10^{-3} Pa.s.

Le premier article qui rapporte une étude numérique du flux et du cisaillement local au sein d'un scaffold poreux en trois dimensions est celui de Porter *et al.* [POR05]. Le scaffold étudié est un échantillon d'os trabéculaire, sa géométrie est obtenue par microtomographie et la simulation du flux est réalisée par la méthode de Lattice-Boltzmann. Les résultats montrent que le champ de vitesse est très hétérogène et que les cisaillements aux parois les plus élevés sont observés sur les surfaces des plus petits canaux du scaffold. Un cisaillement moyen de 5×10^{-5} Pa a été associé avec une bonne viabilité et prolifération cellulaire, tandis qu'un cisaillement moyen supérieur à 10^{-3} Pa a été nuisible à la viabilité des cellules.

Plusieurs autres études ont été menées, avec des scaffolds différents et des méthodes de simulation différentes. Un résumé de ces travaux est donné dans le tableau I-2.

Référence	Scaffold	Méthode numérique	Cisaillement moyen calculé
Porter <i>et al.</i> [POR05]	Os trabéculaire humain	Lattice-Boltzmann	0.05 mPa
Boschetti <i>et al.</i> [BOS06]	Scaffold de PLLA à géométrie périodique	Eléments finis	Modèle de référence : 3.7mPa
Cioffi <i>et al.</i> [CIO06]	Mousse biodégradable de polyestherurethane	Volumes finis	3.94, 3.73, and 3.28 mPa selon le modèle
Cioffi <i>et al.</i> [CIO08]	Mousse de polyéthylène glycol terephthalate/polybutylène terephthalate (PEGT/PBT)	Volumes finis	2.56 and 0.256 mPa selon le flux d'entrée
Sandino <i>et al.</i> [SAN08]	Scaffolds poreux et biodégradable : phosphate de calcium et verre	Eléments finis	Valeurs modales autour de 0.05 mPa
Jungreuthmayer <i>et al.</i> [JUN09 ^b]	Scaffolds de phosphate de calcium et de collagène-glycosaminoglycane	Volumes finis	19.4 et 745.2 mPa

Maes <i>et al.</i> [MAE09]	Scaffolds de titane et d'hydroxyapatite	Volumes finis	1.95 et 1.46 mPa
Milan <i>et al.</i> [MIL09]	Scaffold de PLLA - verre	Eléments finis	Entre 0.04mPa et 40mPa selon le flux d'entrée
Melchels <i>et al.</i> [MEL11]	2 scaffolds de PLLA avec une architecture de pores gyroïde	Volumes finis	31 et 27 mPa
VanGordon <i>et al.</i> [VAN11]	Mousse poreuse en PLLA et scaffold réseau de fibres	Lattice-Boltzmann	Entre 12 mPa and 27 mPa selon le flux d'entrée et la géométrie
Yan <i>et al.</i> [YAN11]	Scaffolds de chitosane-hydroxyapatite à structure régulière	Eléments finis	Entre 1 et 7 mPa
Maes <i>et al.</i> [MAE12]	Scaffolds de titane et d'hydroxyapatite	Volumes finis	1.41 et 1.09 mPa

Tableau I-2 : Etudes numériques réalisées sur différents scaffolds pour évaluer les niveaux de cisaillement aux parois. Tableau initialement réalisé dans le cadre d'une étude bibliographique pour un article publié en 2015 [BOU15]

Dans ce tableau, seuls Sandino *et al.* [SAN08] et Maes *et al.* [MAE12] ont étudié des scaffolds entiers, toutes les autres simulations ont été réalisées sur des sous-modèles, avec pour conséquence possible des artéfacts de conditions aux limites. Sauf exception, les cisaillements calculés sont généralement compris entre 10^{-5} et 10^{-3} Pa, valeurs bien inférieures aux niveaux d'efficacité des expériences 2D ou aux niveaux de cisaillement *in vivo*, comme cela a déjà été dit.

Il est bien évident que ces valeurs numériques dépendent de nombreux paramètres, notamment le flux d'entrée, la porosité, la taille des pores, leur géométrie, la viscosité du fluide. La relation entre le flux d'entrée et le cisaillement moyen obtenu est linéaire dans la mesure où le flux reste laminaire, c'est-à-dire pour des flux d'entrée raisonnablement faibles (termes convectifs de l'équation de Navier-Stokes négligeables) [CIO06, SAN08]. Un cisaillement plus élevé est obtenu lorsque les pores sont plus petits en raison de gradients de vitesse plus élevés [BOS06, JUN09^b]. À taille de pore égale, la porosité n'affecte pas le cisaillement d'après l'étude de Boschetti *et al.* [BOS06]. Le cisaillement moyen varie proportionnellement avec la viscosité du fluide [SAN08].

5.5 Distributions des valeurs de cisaillement et généralisation à l'ensemble des scaffolds

On remarque que pour chaque scaffold ou pour chaque bioréacteur, il est nécessaire de réaliser une simulation pour connaître le cisaillement appliqué aux cellules. Cependant, une étude de Voronov *et al.* [VOR10^b] s'est attelée à trouver une manière de déterminer le cisaillement et sa distribution au sein d'un scaffold a priori, en connaissant seulement quelques paramètres géométriques. Cette équipe a étudié un grand nombre de scaffolds très poreux par simulations de Lattice-Boltzmann et a mis en évidence que la distribution du cisaillement normalisé pour des flux à travers ces milieux très poreux suit une fonction densité de probabilité de type gamma à 3 paramètres qui apparaît être universelle : $\Gamma(\alpha=2.91, \gamma=-1.43, \beta=0.45)$. En faisant ensuite intervenir la loi de Darcy sur les écoulements en milieu poreux et l'équation de Wang et Tarbell sur le cisaillement aux parois de structures périodiques, les auteurs expriment toutes les variables du problème en fonction du cisaillement moyen et des paramètres géométriques. Ainsi, sans simulation systématique, en connaissant le cisaillement moyen (par exemple en l'approximant grâce à l'équation de Goldstein *et al.*, [GOL01]), la distribution et le niveau de cisaillement aux parois d'un scaffold extrêmement poreux peuvent être estimés.

La suite de cette étude, publiée dans l'article de Pham *et al.* [PHA12], a montré que ceci est généralisable à des scaffolds moins poreux (jusqu'à 50% de porosité). En revanche, ce travail montre également que plus la structure du scaffold est régulière, moins la concordance est bonne entre la fonction densité de probabilité de l'échantillon et la fonction gamma de Voronov. Il a été montré qu'une augmentation du flux engendrait un décalage et un étalement de la fonction densité de probabilité vers les plus hauts cisaillements [VAN11]. Cela confirme qu'une augmentation du flux augmente le cisaillement. De plus cela met en évidence le fait

que plus le flux est élevé, moins il existera un pic autour d'une certaine valeur de cisaillement et plus le cisaillement sera homogène.

Conclusion

Après un paragraphe introductif sur la nature du tissu osseux, ce chapitre bibliographique dresse un état de l'art en matière de mécanotransduction et de cultures cellulaires tridimensionnelles dynamiques en bioréacteurs. Les cellules souches mésenchymateuses, les plus utilisées en ingénierie tissulaire osseuse, sont sensibles aux contraintes mécaniques et en particulier aux contraintes de cisaillement. Des cultures dynamiques tridimensionnelles en bioréacteur ont des effets bénéfiques sur la prolifération cellulaire, l'engagement des cellules souches mésenchymateuses sur la voie ostéoblastique, ainsi que l'ostéogénèse. Les scaffolds évoluent au fur et à mesure des recherches et récemment, les scaffolds granulaires ont fait leur apparition. Enfin, dans une optique d'optimisation des stimulations mécaniques au sein des bioréacteurs et de reproductibilité des expériences, des modèles numériques ont été mis en œuvre de manière à caractériser précisément les niveaux et distributions de cisaillement existant au sein des bioréacteurs à perfusion les plus utilisés.

Chapitre II

Effets comparés de contraintes de compression hydrostatique et de cisaillement sur l'activité des cellules souches mésenchymateuses humaines

Résumé

Les contraintes mécaniques auxquelles les cellules sont soumises au sein des bioréacteurs d'ingénierie tissulaire osseuse sont relativement peu connues. Elles sont complexes et constituées d'une combinaison de contraintes de cisaillement et de compression. Les réponses des cellules à de tels stimuli sont des informations fondamentales dans des applications comme l'ingénierie tissulaire, en vue d'une meilleure compréhension des phénomènes entrant en jeu au sein des bioréacteurs et de l'optimisation de ces derniers.

Ainsi, ce chapitre évalue les réponses précoces de cellules souches mésenchymateuses humaines au cisaillement et à la compression hydrostatique. La production de monoxyde d'azote et l'expression de l'ARNm de plusieurs gènes connus comme mécanosensibles, de même que l'activation de ERK1/2 dans la réponse des cellules souches mésenchymateuses (CSM) humaines aux deux stimuli mécaniques testés ont été mesurés et comparés.

1. Introduction

En ingénierie tissulaire, des bioréacteurs ont été développés pour créer un microenvironnement biochimique et biophysique adapté à la viabilité et la prolifération des cellules ainsi qu'à la croissance d'un tissu nouveau. Dans le cas de l'os, de nombreux bioréacteurs ont été développés [YEA13, GAR14]. Ils sont toujours composés d'un scaffold, servant de support tridimensionnel aux cellules souches mésenchymateuses, et d'un milieu de culture en circulation, ce qui permet la nutrition des cellules, l'élimination de leurs déchets, mais aussi l'application de stimuli mécaniques à ces cellules. Cependant, ces stimuli mécaniques sont complexes, bien souvent une combinaison simultanée de cisaillement dû au flux et de compression hydrostatique. Il n'est alors pas possible d'isoler et d'identifier le stimulus mécanique spécifique qui engendre les réponses cellulaires pertinentes à la formation d'un tissu nouveau. L'élucidation de cette question pourrait avoir des implications majeures dans la production de greffons osseux de taille clinique. Il serait alors possible de concevoir les bioréacteurs de manière à cibler spécifiquement ce type de contrainte mécanique.

Les cellules répondent de différentes manières à la perception d'une contrainte mécanique. La littérature rapporte plusieurs effets indiqués ci-après. Le monoxyde d'azote (NO) est un marqueur typique de la réponse cellulaire à un chargement mécanique [KNO98, MIL07]. Il a été montré que les cellules soumises à un stress d'origine mécanique larguent ce produit dans le milieu de culture environnant en fonction du niveau de contrainte appliqué [TJA06, SAN09]. Il est donc possible de quantifier la réponse de cellules à un stimulus mécanique en effectuant un dosage du NO présent dans le milieu de culture après stimulation.

Les contraintes mécaniques engendrent aussi une réponse génique des cellules. En effet, une cellule souche mécano-sensible soumise à un stimulus mécanique peut par exemple commencer un processus de différenciation en ostéoblaste, ce qui passe par l'expression de

gènes caractéristiques. Les principaux gènes impliqués dans la mécanotransduction ou dans la différenciation ostéogénique sont présentés ci-après.

- PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide Synthase 2) code pour une enzyme qui catalyse la synthèse de prostaglandine-E2, arbitre la formation d'os induite par le chargement et est impliqué de manière critique dans la réparation de fracture osseuse *in vivo* [TJA06]. L'expression de PTGS2 par des CSM issues de pulpe dentaire humaine est régulée par du cisaillement [KRA10].
- EGR1 (Early Growth Response 1) code pour un facteur de transcription mécanosensible. Il a été identifié comme jouant un rôle important dans la formation osseuse *in vivo* [REU11^a, REU11^b, PRE14]. EGR1 est aussi impliqué dans la croissance cellulaire, l'apoptose, et la différenciation et contribue au processus de réparation osseuse [REU11^b].
- IER3 (Immediate Early Response 3) est un gène exprimé par les cellules humaines pour produire une protéine qui participe à la voie de signalisation MAPK ERK1/2. En réponse à une stimulation mécanique, ce gène a été surexprimé dans des cellules ligamentaires [WAN11] et artérielles [ARL11].
- PTGES (Prostaglandin E Synthase) est un gène impliqué dans la réponse inflammatoire [THI07].
- IGF1 (Insulin-Like Growth Factor 1) code pour une hormone de croissance et a été identifié comme induisant la croissance et l'hypertrophie *in vitro* et *in vivo* du muscle stimulé mécaniquement et endommagé [KAW12]. IGF1 joue aussi un rôle fondamental dans l'acquisition et la préservation de la masse osseuse [BIK11].
- IGFBP1 (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1) code pour les facteurs de croissance IGF («insuline-like growth factors»), et est impliqué dans les voies d'expression de ERK1/2 et promeut la migration cellulaire [NIE13].

- ITGB1 (Integrin, Beta 1) code pour des récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire qui perçoivent le microenvironnement mécanique et participent à divers processus biologiques dont l'embryogénèse, l'hémostase, la réparation de tissus, la réponse immunitaire et la diffusion métastatique de cellules tumorales [CAR13].
- VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) et FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) interviennent lors d'une situation d'hypoxie et sont impliqués dans le développement vasculaire et l'angiogénèse [STR02].
- RUNX2 (Runt-Related Transcription Factor 2) code pour une protéine essentielle à la différenciation ostéoblastique et à la morphogénèse du squelette [HUG06].
- ALP (Alkaline Phosphatase) est impliqué dans la minéralisation de la matrice osseuse [KRA10].
- HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1) intervient lors d'une situation d'hypoxie et est impliqué dans le processus d'angiogénèse [LEE01].

Les gènes PTGS2, EGR1, IER3, PTGES, IGF1, IGFBP1, ITGB1, VEGFA et FGF2 sont des gènes à réponse précoce tandis que les gènes RUNX2, ALP et HIF1 sont à réponse plus tardive. Tous les gènes précités sont impliqués dans le processus de cicatrisation osseuse. Leur expression peut être analysée par « reverse-transcriptase polymerase chain reaction » (RT-PCR).

Enfin, ERK1/2 est une protéine présente dans le cytoplasme et qui s'active lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée à la cellule. Cette activation se traduit par une phosphorylation et participe à la mécanotransduction cellulaire, spécifiquement à la traduction de signaux mécaniques en signaux biologiques intracellulaires qui régulent la prolifération et la différenciation cellulaire [FAN06, LIU06, KAN07, WAR07]. L'activation de cette protéine peut être mise en évidence par une technique de Western Blot.

Dans la littérature, l'effet du cisaillement sur l'activité des CSM a été largement étudié. Ce type de stimulus mécanique agit sur la prolifération [SCA08, GRE09], l'orientation [OCE08, DON09], la production ou l'activation de certains marqueurs [KLE98, LI04, YI10] et la différenciation des cellules [SCA08, GRE09]. Quelques études montrent également un effet de la compression hydrostatique sur les cellules dans certaines conditions [ALL07, LIU09].

L'objectif de ce chapitre est de déterminer et de comparer les réponses précoces de CSM humaines (cultivées en monocouches sur des plaques planes en polystyrène) lorsque ces cellules sont exposées soit à un cisaillement soit à une compression hydrostatique. Plusieurs niveaux de cisaillement (0.1, 0.7, 2.1 ou 4.2 Pa) et plusieurs niveaux de compression (10000, 50000, 75000 ou 100000 Pa) ont été étudiés. Les mêmes cellules et les mêmes supports de culture ont été utilisés pour toutes les expériences permettant ainsi une comparaison pertinente des deux types de stimulus mécanique.

Différents marqueurs ont été choisis pour étudier les effets du cisaillement et de la compression. Premièrement, la production de NO a été étudiée par dosage colorimétrique. Cette étape a permis d'identifier et de sélectionner le cisaillement le plus efficace ainsi que la compression la plus efficace dans la gamme de sollicitation précitée. Ces niveaux de contraintes optimaux ont été utilisés dans la suite des analyses. Notamment, l'expression d'une sélection de gènes mécano-sensibles à réponse précoce, sensibles à l'hypoxie et/ou ostéogéniques a été étudiée par RT-PCR. Enfin, l'activation de la voie ERK1/2, c'est-à-dire la phosphorylation de cette protéine qui participe à la mécanotransduction cellulaire, a été étudiée.

2. Matériels et méthodes

Dans la suite, à chaque fois qu'il est écrit « dans les conditions classiques de culture », cela signifie dans un incubateur humidifié, à 37°C et avec 5% de CO₂.

2.1 Dispositif de compression

Un dispositif sur mesure a été développé pour permettre une culture de cellules sous contrainte de compression. Un schéma de principe est présenté figure II-1. Il est composé d'une chambre confinée en acier inoxydable et d'un compresseur, reliés par un système de valves, et pilotés par ordinateur. De manière classique, les cellules sontensemencées au fond de boîte de cultures et immergées dans un milieu de culture. Le principe est d'augmenter la pression de la phase gazeuse au-dessus du milieu de culture. Cette augmentation de pression à la surface du milieu est transmise dans tout le liquide et les cellules sont alors sollicitées en compression de manière hydrostatique.

Plus précisément, un programme Labview (National Instruments, France) pilote le fonctionnement d'un système de valves solénoïdes présent entre le compresseur et la chambre, en fonction du niveau de pression voulu, contrôlé en permanence par un capteur. Le programme permet d'appliquer une pression de manière cyclique et sinusoïdale entre 0 et 100 000 Pa avec une fréquence entre 0 et 2 Hz. Une chambre de contrôle similaire en tout point mais non exposée à la pression est utilisée pour les échantillons contrôles. Pendant les expériences, les deux chambres sont maintenues dans les conditions standards de culture.

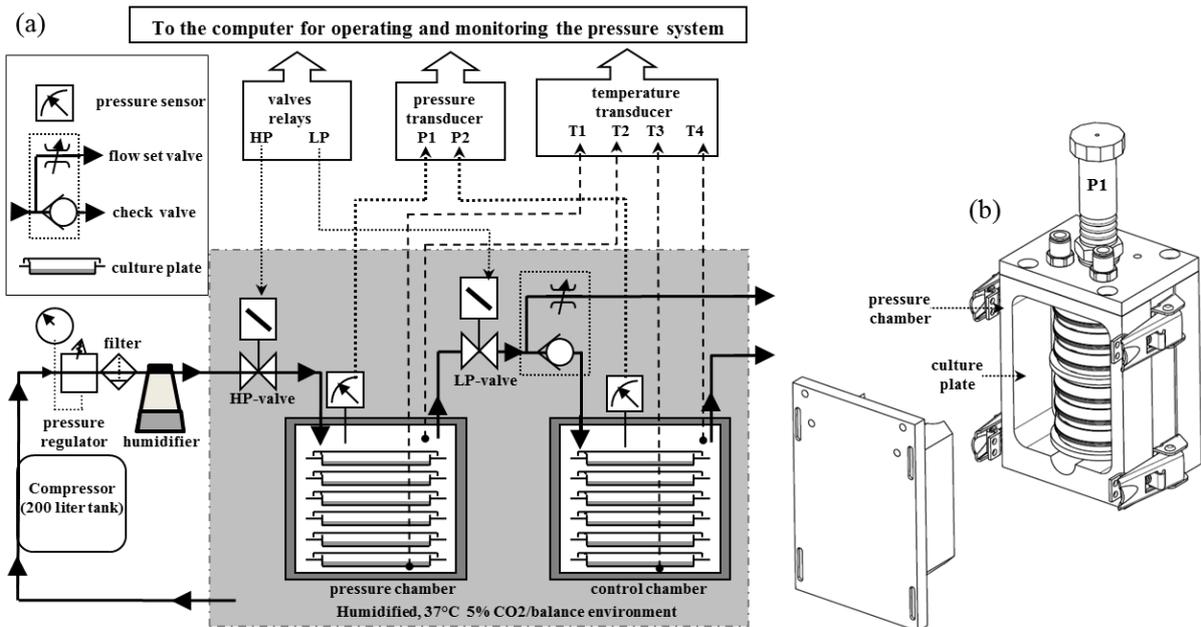


Figure II-1 : Schéma de principe du système développé au laboratoire pour exposer les cellules à une compression hydrostatique.

2.2 Dispositif de cisaillement

Le dispositif commercial Ibidi (Ibidi-Integrated BioDiagnostics, Allemagne) a été utilisé pour permettre une culture de cellules sous contrainte de cisaillement. Un schéma de principe est présenté figure II-2. Il est composé d'une lame sur laquelle est collée une plaque formant ainsi un tunnel de surface 5 x 50 mm et de hauteur 0.4 mm. Le principe est de mettre en circulation le milieu de culture de manière unidirectionnelle dans ce tunnel de faible épaisseur pour créer une contrainte de cisaillement au niveau de la lame sur laquelle les cellules sontensemencées.

Plus précisément, le système est composé d'une pompe pilotée par ordinateur, de deux réservoirs de milieu de culture (seringues), d'un système de perfusion et de valves et de la lame. Le fluide circule de manière unidirectionnelle, continue ou pulsatile. La pompe produit une pression au niveau des seringues, générant un débit de 0.03 à 35 mL/min qui peut créer des cisaillements de 0.03 à 15 Pa respectivement. Lors des expériences, le système est maintenu dans les conditions standards de culture.

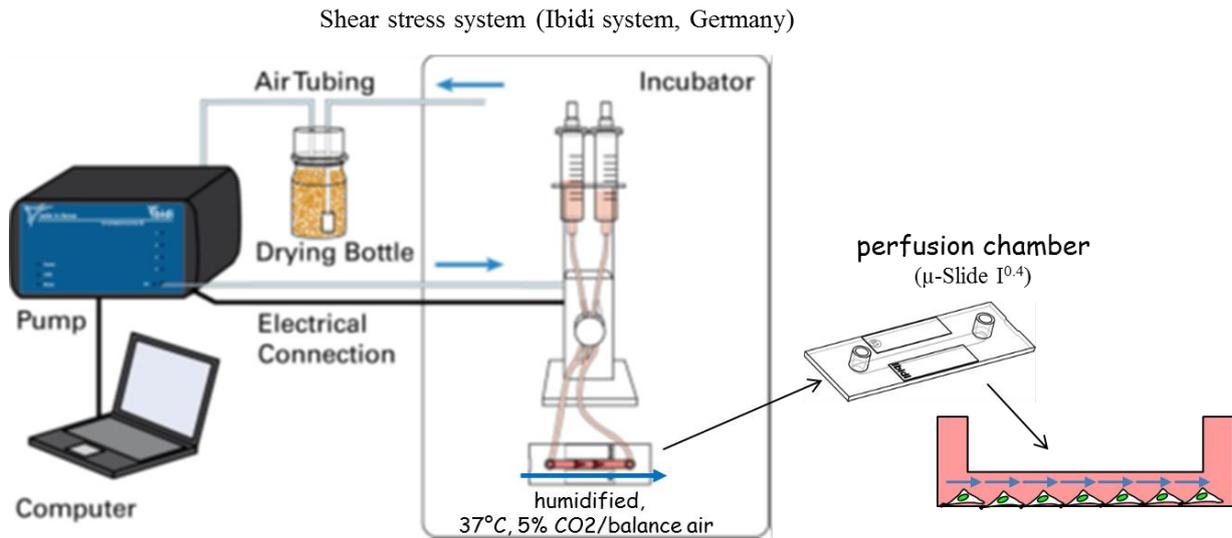


Figure II-2 : Schéma du système Ibidi utilisé pour exposer les cellules à une contrainte de cisaillement.

2.3 Cellules souches mésenchymateuses humaines : extraction et préparation.

Les cellules souches mésenchymateuses humaines utilisées dans cette étude ont été extraites d'échantillons de moelle osseuse. Ces échantillons sont issus de déchets opératoires osseux, avec le consentement éclairé des patients et en accord avec les procédures du comité d'éthique. Les cellules utilisées pour le dosage du monoxyde d'azote sont issues d'un prélèvement de moelle osseuse sur déchets opératoire issus d'un patient âgé de 16 ans. Les cellules utilisées pour les expériences suivantes (expression génique et phosphorylation de ERK1/2) sont un mélange de cellules issues de prélèvements de moelle osseuse sur déchets opératoire issus de 6 patients différents.

La procédure d'extraction est la suivante : la moelle osseuse est aspirée de l'échantillon d'os puis diluée dans du milieu de culture α -MEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (α -MEM-10%SVF). Les CSM sont dites « adhérentes », ce sont les seules cellules de la moelle osseuse à adhérer au plastique. Elles peuvent ainsi facilement être isolées des autres. La suspension de cellules primaires obtenue est donc mise en culture dans des boîtes de

culture classiques, en polystyrène. Le premier changement de milieu réalisé après environ 3 jours de culture permet de retirer toutes les cellules non-adhérentes. La suite de la préparation des cellules se déroule dans les conditions standards de culture.

2.4 Expériences de compression et de cisaillement

La veille de l'expérience, les cellules sont décollées de leur boîte de culture et réensemencées dans des boîtes de culture rondes en polystyrène de 6 cm de diamètre pour la compression ou sur les lames Ibidi pour le cisaillement à une densité de 44.10^3 cellules/cm². Après 2h d'adhésion dans du milieu α -MEM-10%SVF, le milieu est remplacé par du milieu α -MEM-2%SVF (α -MEM supplémenté avec 2% de sérum de veau fœtal). Ce milieu est changé 30 minutes avant l'exposition à la contrainte mécanique.

3 boîtes de cultures sont placées dans la chambre pressurisée. Les cellules sont soumises à des compressions de 10000, 50000, 75000 ou 100000 Pa pendant 30 minutes à 2 Hz. Les contrôles sont maintenus en parallèle dans des conditions identiques mais sans exposition à la compression.

Le cisaillement est appliqué en connectant la lame Ibidi au système pompe-seringues. Les cellules sont exposées à un cisaillement de 0.1, 0.7, 2.1 ou 4.2 Pa pendant 30 minutes à 2.8 Hz. Les contrôles sont maintenus en parallèle dans des conditions identiques mais sans exposition au cisaillement.

2.5 Analyses évaluant la réponse des CSM humaines aux stimuli mécaniques

2.5.1 Dosage du monoxyde d'azote NO

Le monoxyde d'azote produit par les cellules est présent dans le milieu surnageant sous la forme de métabolites NO_2^- et NO_3^- . Ceux-ci se dégradent assez rapidement donc le dosage doit être réalisé immédiatement après l'expérience. Le milieu surnageant après sollicitation est prélevé ainsi que celui du contrôle correspondant. Le dosage est effectué grâce au réactif de Griess (H_3PO_4 , 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine). Celui-ci réagit avec les ions nitrite et nitrate pour former un composé azo de couleur violette. La concentration en nitrate/nitrite est déterminée par dosage colorimétrique. La droite d'étalonnage est préparée grâce à une série de solutions de NaNO_2 diluées dans du sérum α -MEM-2%SVF, aux concentrations allant de 5 à 35 μM . L'absorbance de chaque solution est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. La concentration en NO de l'échantillon issu des expériences de stimulation mécanique est obtenue en comparant l'absorbance de la solution après la réaction à la droite d'étalonnage.

2.5.2 Mesure de l'expression génique par RT-PCR en temps réel

Les cellules sont récoltées après expériences à certains temps spécifiques : 0h, 1h et 6h après l'exposition aux stimulations mécaniques. L'ARN total est isolé des CSM humaines grâce à du TRIzol[®] (Invitrogen, France), qui dénature les membranes cellulaires et nucléaires. La concentration et la pureté de l'ARN sont contrôlées. Cet ARN total est ensuite « rétrotranscrit » en ADN complémentaire (ADNc) : L'ARN est dénaturé, des amorces se fixent dessus puis une enzyme appelée reverse transcriptase crée le brin d'ADN complémentaire correspondant.

La PCR en temps réel est effectuée à partir de cet ADNc. L'ADNc correspondant aux gènes suivants est amplifié : PTGS2, PTGES, IER3, EGR1, RUNX2, ALP, HIF1A, VEGFA,

ITGB1, FGF2, IGF1, IGF1BP1 et 18S. Le gène 18S est un gène de ménage qui a une expression constante dans les CSM humaines, il est utilisé comme contrôle interne. L'expression génique est calculée de manière relative par rapport au contrôle par la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.5.3 Mesure de la phosphorylation de ERK1/2 par Western Blot

Après stimulation mécanique, les protéines sont extraites des CSM humaines avec un tampon de lyse. La concentration totale en protéines est déterminée. Une méthode de « Western Blot » est utilisée pour la détection des protéines ERK1/2 et β -tubuline. La β -tubuline est une protéine intrinsèque toujours présente dans les cellules en même quantité et non sensible aux contraintes mécaniques.

Les échantillons protéiques sont déposés sur un gel d'électrophorèse. Un courant électrique est appliqué, les protéines migrent, à des vitesses différentes en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines sont ensuite électrotransférées sur une membrane de cellulose. Cette membrane est ensuite bloquée pour limiter les interactions non spécifiques entre les anticorps et la membrane. Les anticorps anti-ERK1/2 phosphorylé et anti β -tubuline sont mis en contact avec la membrane pour l'étape de la détection. Un anticorps secondaire luminescent est fixé sur ces anticorps et les bandes de protéines sont détectées de manière semi-quantitative par densitométrie. Les valeurs de phosphorylation de ERK1/2 sont normalisées par le niveau respectif des protéines β -tubuline.

2.5.4 Inhibition et activation de ERK1/2 phosphorylé

Pour confirmer le rôle de ERK1/2 dans la réponse des cellules à une stimulation mécanique, des expériences vont être réalisées :

- d'une part en inhibant la phosphorylation de ERK1/2 avec l'enzyme U0126,

- d'autre part en induisant la phosphorylation de ERK1/2 avec du PMA.

2.6 Analyses statistiques

Les données sont analysées grâce à des tests T de Student pour déterminer des différences statistiquement significatives. L'intervalle de confiance est fixé à 95% et le niveau de significativité à 5%. Toutes les données des expériences sont obtenues sous forme de tripliquas.

3. Résultats

3.1 Calibration des systèmes mécaniques

Dans le système de compression, la température est contrôlée tout au long de l'expérience. La hausse maximum de température observée a été de 0.5°C à 100000 Pa et 2 Hz pendant 3 heures. Pour valider la pression appliquée, avant chaque expérience, une pression de 50000 Pa est imposée dans les deux chambres de compression et les valeurs de pression sont mesurées et vérifiées grâce au capteur.

Le logiciel de contrôle de la pompe Ibidi contrôle la pression sortante appliquée à l'unité fluïdique. Le cisaillement dû au flux est seulement une résultante de l'application de cette pression sortante, du set de perfusion et de la microlame spécifique. Avant chaque expérience, le flux est mesuré selon la procédure Ibidi pour s'assurer que le cisaillement appliqué aux cellules corresponde bien à la valeur choisie.

Ces résultats de calibration fournissent l'assurance de la performance de ces deux systèmes mécaniques utilisés pour les expériences sur les cellules.

3.2 Effet des stimuli mécaniques sur le relargage de NO

Les résultats des dosages de monoxyde d'azote sont présentés sur la figure II-3.

La concentration moyenne en NO (combinaison de NO_2^- et NO_3^-) dans le milieu surnageant des CSM humaines non exposées au cisaillement pendant 30 minutes (contrôles) est de $1.74 \pm 1.19 \mu\text{M}$. Les CSM humaines exposées à des cisaillements de 0.1, 0.7, 2.1 et 4.2 Pa pendant 30 minutes présentent des niveaux de NO de 9.22 ± 7.37 , 24.62 ± 8.98 , 15.24 ± 11.41 et $8.61 \pm 7.39 \mu\text{M}$ respectivement. Les ratios d'augmentation de NO dans le surnageant des cellules exposées au cisaillement pendant 30 minutes sont donc de 5.28, 14.11, 8.73 et 4.93 pour 0.1, 0.7, 2.1 et 4.2 Pa respectivement. Ces augmentations sont significatives par rapport aux contrôles pour les cisaillements de 0.7 et 2.1 Pa ($p < 0.05$). Le relargage de NO maximal est obtenu pour un cisaillement de 0.7 Pa pendant 30 minutes.

La concentration moyenne en NO (combinaison de NO_2^- et NO_3^-) dans le milieu surnageant des CSM humaines non exposées à une compression pendant 30 minutes (contrôles) est de $1.80 \pm 1.76 \mu\text{M}$. Les CSM humaines exposées à des compressions de 10000, 50000, 75000 et 100000 Pa pendant 30 minutes présentent des niveaux de NO de 1.15 ± 0.11 , 4.69 ± 1.75 , 2.81 ± 2.17 et $3.62 \pm 1.73 \mu\text{M}$ respectivement. Les ratios d'augmentation de NO dans le surnageant des cellules exposées à la compression pendant 30 minutes sont donc de 0.64, 2.60, 1.56 et 1.69 pour 10000, 50000, 75000 et 100000 Pa respectivement. Une de ces augmentations seulement est significative par rapport aux contrôles pour une compression de 50000 Pa pendant 30 minutes ($p < 0.05$).

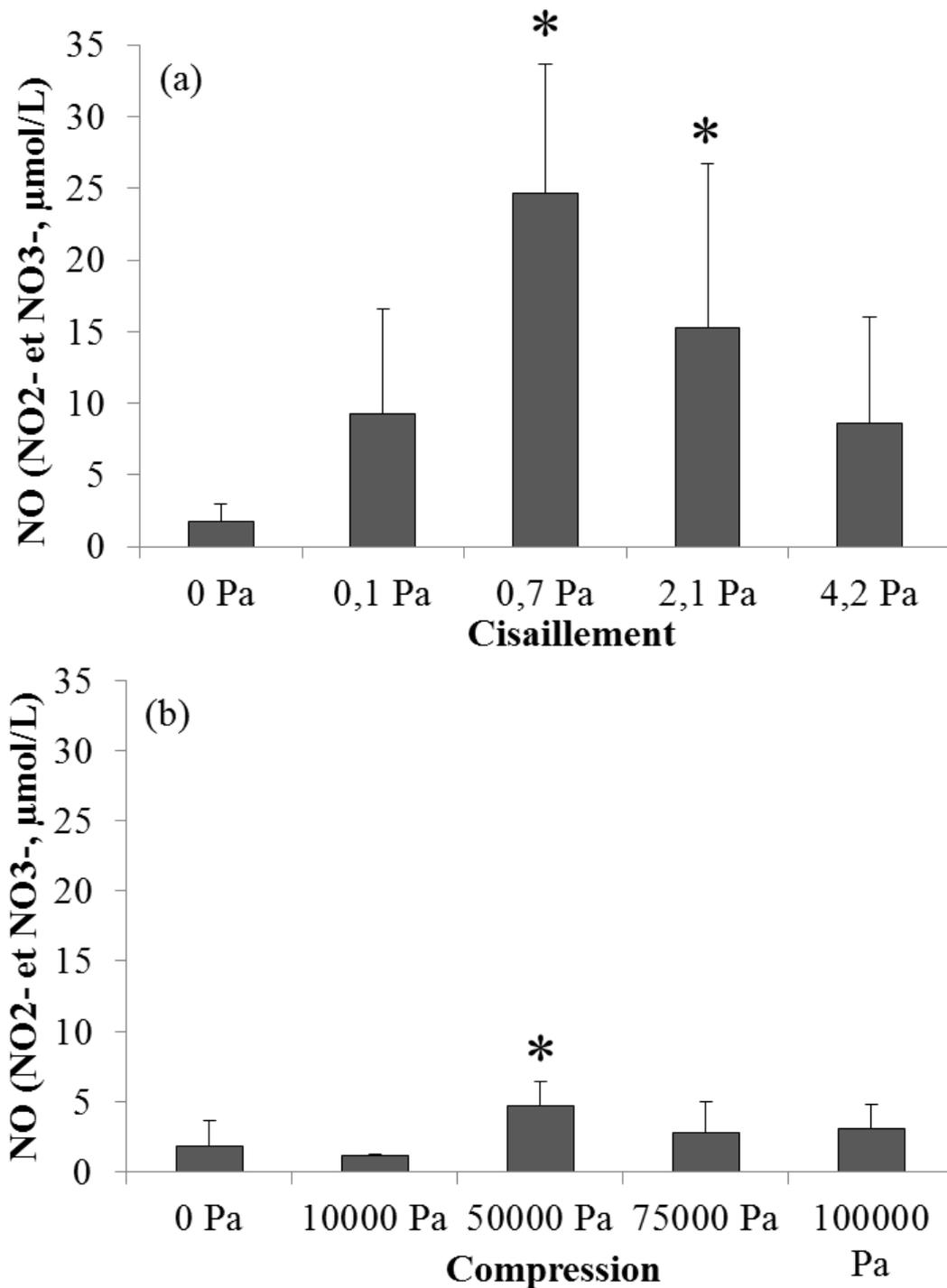


Figure II-3 : Effets du cisaillement (a) et de la compression hydrostatique (b) sur la production de monoxyde d'azote par les CSM humaines. Les étoiles (*) montrent les cas où une différence significative est observée par rapport au contrôle.

3.3 Effet des stimuli mécaniques sur l'expression génique

Les résultats des RT-PCR sont présentés figure II-4 et décrits ci-après.

3.3.1 Expression des gènes à réponse précoce

Les 9 gènes à réponse précoce suivants ont été étudiés : PTGS2, PTGES, IER3, EGR1, ITGB1, FGF2, IGF1, IGFBP1 et VEGFA. Ces gènes sont reconnus pour être caractéristiques d'une réponse précoce des cellules à un stimulus mécanique. Des échantillons d'ARN ont été récoltés immédiatement, une heure et 6 heures après exposition des CSM humaines aux deux types de stimuli mécaniques et ont été analysés par RT-PCR en temps réel.

Par rapport aux contrôles, les cellules ayant subi un cisaillement de 0.7 Pa à 2 Hz pendant 30 minutes ont présenté, immédiatement après la stimulation, une augmentation relative d'expression de 36.02 pour PTGS2, de 8.33 pour IER3, 14.73 pour EGR1, de 10.23 pour IGF1 et de 28.14 pour IGBP1. Ces valeurs sont plus élevées lorsque la mesure est effectuée 1h après la stimulation. Elles sont de 56.90 pour PTGS2, de 17.87 pour IER3, de 17.31 pour IGF1, de 38.93 pour IGFBP1, de 8.02 pour ITGB1, 16.74 pour FGF2 et 14.31 pour VEGFA. Six heures après l'exposition au cisaillement, la surexpression des gènes diminue mais reste significativement élevée pour PTGS2 (x22.25), IER3 (x7.4), IGF1 (x5.2) et IGBP1 (x26.9). L'expression du gène PTGES n'a par contre pas été significativement modifiée par le cisaillement.

Quel que soit le temps entre l'expérience et l'analyse génique (0, 1h ou 6h), l'exposition des CSM humaines à une contrainte de compression de 50000 Pa et 2 Hz pendant 30 minutes ne produit aucune augmentation significative de l'expression des gènes suivants : PTGS2, PTGES, IER3, EGR1, IGF1, IGBP1, ITGB1, FGF2 et VEGFA.

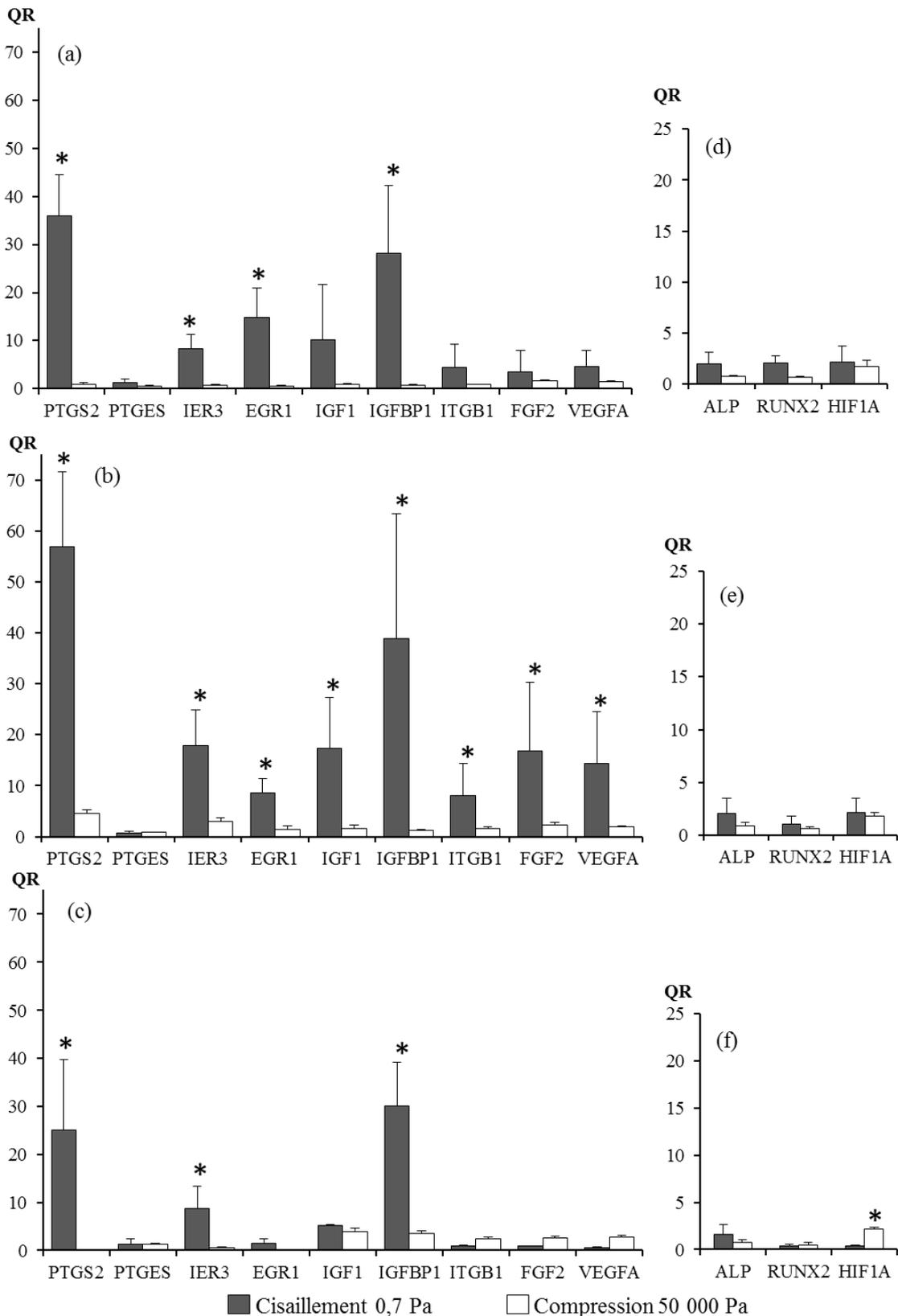


Figure II-4 : Expression d'une sélection de gènes 0h (a et d), 1h (b et e) et 6h (c et f) après exposition des CSM humaines à un cisaillement (0.7 Pa, 2.8 Hz, 30min) ou à une compression hydrostatique (50000 Pa, 2 Hz, 30min). QR signifie quantité relative, les valeurs présentées étant normalisées par rapport au contrôle lors du calcul des $\Delta\Delta CT$. Les étoiles (*) montrent les cas où une différence significative est observée par rapport au contrôle.

3.3.2 Expression des gènes *RUNX2*, *ALP* et *HIF1A*

L'effet d'un stimulus mécanique sur la différenciation ostéogénique des CSM humaines est testé en examinant les expressions des gènes *RUNX2* et *ALP*. Elles sont en fait similaires à celles de leur contrôle respectif après exposition au cisaillement et à la compression.

Six heures après l'exposition des CSM humaines au cisaillement (0.7 Pa et 2.8 Hz pendant 30 minutes), l'expression du gène *HIF1A* a augmenté de 0.36 en proportion. Au contraire, six heures après l'exposition à la compression hydrostatique (10000 Pa, 2Hz, 30 minutes), l'expression du gène *HIF1A* a augmenté de 2.13 en proportion.

3.4 Effet des stimuli mécaniques sur la phosphorylation de ERK1/2

La figure II-5-A présente les résultats des western blots sur la phosphorylation de ERK1/2 sous cinq conditions de culture différentes :

- CSM humaines non exposées à la compression
- CSM humaines exposées à la compression (50000 Pa, 2 Hz, 30 min)
- CSM humaines non exposées au cisaillement
- CSM humaines exposées au cisaillement (0.7 Pa, 2.8 Hz, 30 min)
- CSM humaines prétraitées avec U0126 (inhibiteur spécifique de ERK1/2) avant exposition au cisaillement de 0.7 Pa à 2.8 Hz pendant 30 minutes.

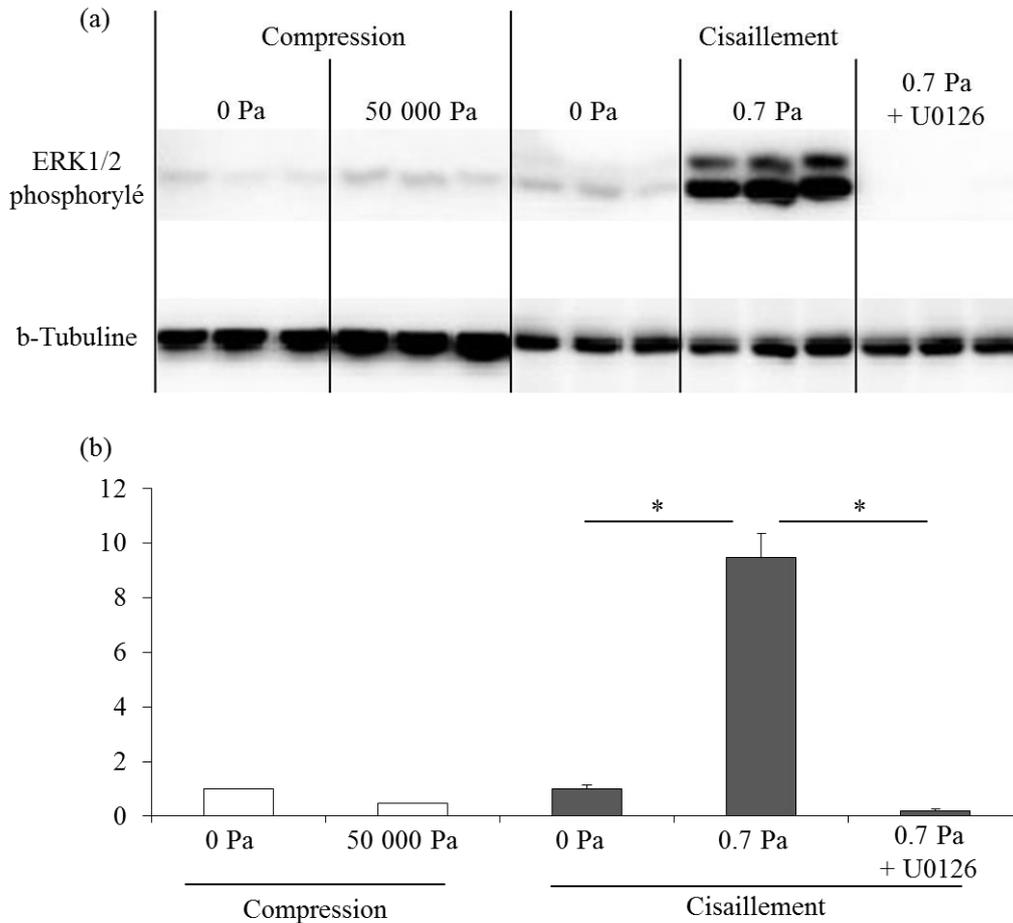


Figure II-5 : Activation de ERK1/2 en réponse des CSM humaines au cisaillement ou à la compression. (a) Phosphorylation de ERK1/2 détectée par une technique de Western Blot, la β -tubuline servant de contrôle interne. (b) Induction de la phosphorylation de ERK1/2. Les étoiles (*) montrent les différences significatives obtenues entre les différents cas testés.

L'augmentation relative de la bande de ERK1/2 phosphorylé est normalisée par la bande de β -tubuline. On s'affranchit ainsi des variations éventuelles de quantité d'échantillon déposée sur la membrane. La seule modification significative du niveau de phosphorylation de ERK1/2 est observée lorsque les cellules sont soumises à un cisaillement de 0.7 Pa, 2.8 Hz, 30 min (augmentation relative de 9.46 ± 0.89). Le traitement au U0126 précédent ce type de cisaillement a empêché la phosphorylation de ERK1/2. Le niveau de ERK1/2 phosphorylé n'a pas été modifié par l'application d'une pression de 50000 Pa à 2 Hz pendant 30 minutes.

4. Discussion et conclusion

Dans cette étude, les réponses précoces des CSM humaines à une sollicitation mécanique de cisaillement et de compression hydrostatique ont été étudiées et comparées. Le but était de déterminer quel était le stimulus mécanique le plus efficace pour la différenciation ostéoblastique et les fonctions ostéogéniques des CSM humaines. Dans ce but, un panel de biomarqueurs a été testé pour comparer les réponses des CSM humaines au cisaillement et à la compression.

Premièrement, la production de NO a été induite par 30 minutes d'exposition à l'un ou l'autre type des stimuli mécaniques étudiés. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui a rapporté des productions de NO en réponse à des cisaillements intermittent ou continu de 0.6 ou 1 Pa et une fréquence oscillatoire de 5 Hz pour divers types de cellules : CSM humaines issues de pulpe dentaire [KRA10], de tissu adipeux [TJA06, BAS10], CSM de chèvre issues de tissu adipeux [KNI05], ostéoblastes [MUL06] et ostéocytes de souris [SAN09]. A notre connaissance, cette étude est la première à montrer que les CSM humaines issues de la moelle osseuse humaine produisent du NO en réponse à un stimulus de compression hydrostatique.

Ces résultats de production de NO sont obtenus pour des cellules cultivées sur des substrats rigides et exposées à une contrainte mécanique simple et spécifique. Au contraire, lorsque les cellulesensemencées dans des scaffolds 3D sont cultivées en bioréacteur, elles sont exposées à des stimuli mécaniques complexes, combinant cisaillement, compression hydrostatique et étirement. Dans les conditions de l'étude, les niveaux maximaux de production de NO ont été obtenus lorsque les CSM humaines ont été exposées à un cisaillement de 0.7 Pa et à une compression de 50000 Pa. Ces niveaux de contrainte ont donc été considérés comme optimaux et ont été utilisés dans les expériences suivantes, conduites pour comparer les réponses des CSM humaines au cisaillement et à la compression. De plus, la production de NO était significativement plus élevée ($p < 0.05$) après exposition des CSM humaines au

cisaillement qu'à la compression (précisément 14 fois vs 2.6 plus grand respectivement). Ceci suggère que, par comparaison, le cisaillement est plus efficace que la compression pour obtenir un relargage de NO des CSM humaines.

L'expression d'ARNm d'un panel sélectionné de gènes mécano-sensibles a été évaluée aux niveaux de contraintes optimaux de chaque stimulus établis dans cette étude (ie 0.7 Pa pour le cisaillement et 50000 Pa pour la compression). Les aspects notables de ces résultats sont le grand nombre de gènes affectés, les différences notables d'expression génique dans la réponse des CSM humaines aux deux stimuli mécaniques testés, et surtout l'étendue de la bioactivité des composés respectifs.

PTGS2 a présenté la plus grande augmentation d'expression sous les 2 conditions de stimulation mécaniques optimales testées. De plus, au moment du pic de l'augmentation d'expression (ie 1 heure après l'exposition au stimulus mécanique) le cisaillement est plus efficace que la compression pour induire l'augmentation d'expression de PTGS2 (56 fois vs 4.2 fois respectivement par rapport au contrôles respectifs) ; cette tendance est similaire à ce qui a été observé dans cette étude pour le relargage de NO. Des tendances similaires dans la réponse des CSM humaines aux contraintes mécaniques testées sont observées pour tous les autres gènes étudiés dans ce travail (ie PTGES, IER3, EGR1, IGF1, IGFBP1, ITGB1, VEGFA et FGF2).

Cette étude fournit la première preuve que (i) PTGS2, IER3, EGR1, IGF1, IGFBP1, ITGB1, VEGFA et FGF2 sont exprimés en réponse des CSM humaines à l'exposition au cisaillement et que (ii) FGF2 (mais pas PTGES, EGR1 et VEGFA) est impliqué dans la réponse des CSM humaines à la compression. Enfin, l'expression observée de gènes mécano-sensibles est retournée à son niveau basal entre 6 et 24 heures après l'exposition des cellules au stimulus mécanique. Ce résultat est pertinent et applicable à l'utilisation de bioréacteurs utilisés en

ingénierie tissulaire : pour promouvoir les niveaux de réponses des gènes précités, une exposition répétée des cellules au stimulus mécanique est nécessaire toutes les 6 à 24 heures.

Les effets des stimuli mécaniques pour induire une différenciation des CSM le long de certaines voies phénotypiques spécifiques ont été largement étudiés en raison de leur grand intérêt en biologie et en ingénierie tissulaire. L'expression de RUNX2 des CSM humaines exposées aux deux types de stimuli mécaniques testés dans cette étude était similaire à celle obtenue pour les contrôles correspondants. Ces résultats sont en accord avec la littérature, aucun changement de l'expression génique de RUNX2 n'a été observé après l'exposition des CSM humaines au cisaillement de 1.2 Pa pendant 30 minutes [GRE09]. En revanche, d'autres articles rapportent une augmentation de l'expression des gènes associés à la voie ostéogénique (RUNX2, Osterix, ALP) quand des cellules ostéocompétentes (MC3T3, CSM humaines) sont exposées au cisaillement [SCA08, KRA10, MIL07]. Le désaccord entre ces résultats peut être dû aux différences de conditions expérimentales utilisées dans les différentes études notamment : le milieu de culture [SCA08, SHA09, KRA10], la nature du matériau, la structure tridimensionnelle des scaffolds [HOL05, BAN11, LIU11, LIU12], le type de stimulus mécanique et enfin l'origine (cellules primaires ou de lignées) et les espèces des cellules étudiées (humain, rat, chèvre, brebis). Les résultats de ce travail se sont concentrés exclusivement sur les réponses précoces (0, 1h et 6h après stimulation) des CSM humaines suivant une exposition de 30 minutes à un chargement mécanique. Ils suggèrent ainsi que des expositions plus longues de cellules ostéocompétentes favorisent la différenciation ostéogénique, ce qui est en accord avec la littérature [HOL05, KRA10, BAN11, LIU11]. Enfin, la diminution de l'expression de HIF1A observée 6 heures après l'exposition des CSM humaines au cisaillement suggère qu'un environnement de cisaillement fournit les conditions pour un transport d'oxygène efficace. HIF1 est un régulateur clé surexprimé en cas de tension en oxygène basse.

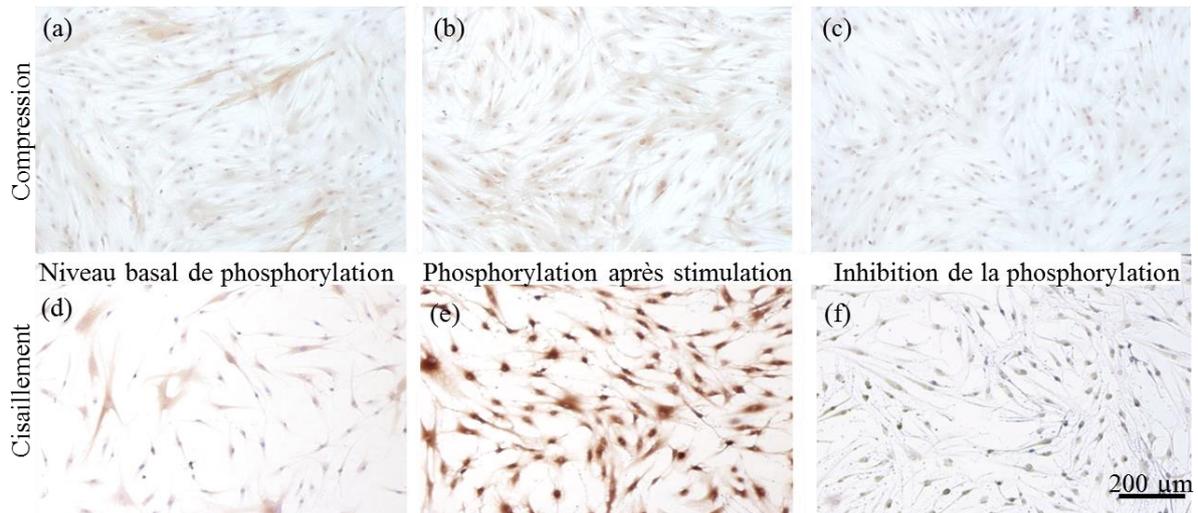


Figure II-6 : Preuve qualitative de l'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK1/2 dans les CSM humaines exposées au cisaillement. Photographies en microscopie optique de CSM humaines immuno-marquées pour la phosphorylation de ERK1/2, qui induit une coloration du cytoplasme des cellules en marron.

Pour confirmer son rôle dans les mécanismes de mécanotransduction, l'activation de ERK1/2 sous cisaillement et sous compression a été examinée. L'activation de ERK1/2 est survenue quand les CSM humaines ont été exposées au cisaillement. La confirmation de la médiation de ERK1/2 a été fournie par le fait que U0126, un inhibiteur spécifique de l'activation de ERK1/2, a aboli l'effet du cisaillement sur l'activation précoce du gène PTGS2 (cf figure II-6). Ce résultat est similaire à celui observé et rapporté avec les CSM humaines de pulpe dentaire [KRA10]. Au contraire, ERK1/2 n'a pas été activé quand les CSM humaines ont été exposées à la compression. A cet égard, les résultats de ce travail diffèrent de la littérature qui rapporte que l'exposition des CSM humaines à la compression hydrostatique a résulté en une activation précoce de la voie de signalisation ERK1/2 [KIM07, PEL12]. Ces différences peuvent être expliquées en prenant en considération le fait que, quand les CSM humaines ensemencées sur des scaffolds de fibres ou de PLLA sont soumises à une compression, elles sont probablement exposées simultanément non seulement à une compression mais aussi à une déformation du substrat polymérique sous-jacent [SIM03]. De plus, la compression de tels scaffolds sous compression hydrostatique peut également induire un cisaillement à travers le flux de fluide dans la structure du scaffold poreux.

En résumé, l'exposition des CSM humaines au cisaillement a induit une augmentation claire de tous les marqueurs géniques ou moléculaires testés. Cela prouve l'importance de ce stimulus mécanique dans la réponse de ces cellules souches parce que ces composés bioactifs sont impliqués dans la régulation et/ou le contrôle de divers aspects du processus de réparation du tissu. Au contraire, l'exposition des CSM humaines à la compression a résulté en une surexpression légère de seulement certains des gènes testés, mais pas d'augmentation de la voie ERK1/2 suggérant que les CSM humaines ne répondent pas à une contrainte de compression. Ces résultats établissent que par rapport à la compression, le cisaillement est un stimulus plus efficace pour induire des réponses des CSM humaines pertinentes par rapport au processus de réparation osseuse. De tels résultats ont une pertinence importante pour des applications biomédicales.

Ces résultats seront utilisés dans le chapitre suivant dans une optique de fournir des microenvironnements appropriés pour exposer les cellules souches à des contraintes mécaniques efficaces.

Chapitre III

Etude numérique de l'efficacité de scaffolds granulaires pour convertir un flux en stimulation mécanique en ingénierie tissulaire osseuse

Résumé

En ingénierie tissulaire osseuse, la maîtrise de l'environnement mécanique au sein des bioréacteurs représente un élément clé dans leur optimisation. Des effets positifs d'un flux de milieu de culture ont été observés dans des bioréacteurs 3D, mais les contraintes appliquées localement aux cellules demeurent inconnues. Ce défaut d'information a conduit au développement d'outils numériques pour déterminer le microenvironnement mécanique des cellules au sein des bioréacteurs. Récemment, une nouvelle géométrie de scaffolds a fait son apparition : des empilements granulaires. Dans ce chapitre, l'objectif principal est de comparer l'efficacité de tels scaffolds avec celle des autres scaffolds présentés dans la littérature en termes de niveau et de distribution de cisaillement. Dans ce but, trois différents types d'empilements granulaires ont été générés par une méthode d'éléments discrets, et une méthode numérique de dynamique des fluides (computational fluid dynamics : CFD) a ensuite été utilisée pour simuler le flux à travers ces empilements. Les niveaux et les distributions de cisaillement ont été déterminés. Une relation linéaire entre le cisaillement et la vitesse d'entrée a été observée, et sa pente est similaire à celles de données de la littérature. Les distributions de cisaillement normalisé obtenues sont indépendantes de la vitesse d'entrée et très comparables à celles des scaffolds poreux. Les empilements granulaires présentent des caractéristiques similaires aux scaffolds massifs poreux dont l'utilisation est très répandue et présentent l'avantage d'être faciles à manipuler et à ensemercer. Les méthodes développées dans ce chapitre sont généralisables à l'étude d'autres configurations d'empilements granulaires. L'ensemble des résultats de ce chapitre a fait l'objet d'un article publié en 2015 [CRU15].

1. Introduction

Il existe de nombreux types différents de scaffolds présentés dans la littérature utilisés dans les bioréacteurs à perfusion. Les mousses extrêmement poreuses sont les plus présentes [HOL05, DAT06, TAN05, CIO06, VAN11, LIU12] mais des « réseaux de fibres » [VAN11, RAI02, SIK03, SIK05, ZHA07] et des scaffolds à architecture régulière [BOS06, OLI09, MEL11] sont aussi décrits. Tous ces scaffolds sont massifs et poreux et les cellules sontensemencées par perfusion d'une suspension cellulaire. Au sein de ces scaffolds poreux tridimensionnels divers, de faibles flux ont conduit à une prolifération cellulaire accrue [HOL05, VAN11] ainsi qu'à des effets ostéogéniques : la surexpression de gènes impliqués dans la mécanotransduction [TAN05, LIU12] et l'augmentation de l'activité de l'alcaline phosphatase [GOM03, ZHA07]. Cependant, en raison de la complexité de la géométrie tridimensionnelle des scaffolds et de leur mode de perfusion, les contraintes mécaniques ressenties par les cellules ne sont pas homogènes et ne peuvent pas être prédites analytiquement. Dans ce contexte, des outils numériques ont été largement utilisés pour évaluer les niveaux et les distributions de cisaillement au sein des scaffolds actuels. Les géométries des modèles ont été soit déterminées par microtomographie, soit créées avec des objets géométriques. Les simulations ont été réalisées par méthode de dynamique des fluides numérique (« computational fluid dynamics ») [CIO06, RAI02, SAN08, JUN09^b, MAE12, ZER14] ou par méthode de Lattice-Boltzmann [VAN11, POR05]. Aux flux utilisés expérimentalement, les niveaux de cisaillement évalués avec les techniques de simulation prennent des valeurs entre 10^{-5} et 10^{-2} Pa. Réaliser une étude numérique systématique dès le développement d'un nouveau scaffold poreux est contraignant. En 2010, Voronov *et al.* [VOR10^b] ont donc étudié un ensemble important de scaffolds poreux et ont pu définir une fonction gamma à 3 paramètres spécifique qui prédit d'une manière simple les fonctions

densités de probabilité de tous les scaffolds. Cette fonction a aussi été validée pour d'autres scaffolds poreux de la littérature.

Récemment, une nouvelle configuration possible de scaffold a été envisagée et étudiée : des empilements de particules [DAV11, YEA11^a, YEA11^b, PHA14, ORR08]. Plutôt que d'être massifs, ces scaffolds sont composés d'un assemblage de plusieurs particules de biomatériau sur lesquelles les cellules sontensemencées. Dans un contexte clinique, de tels scaffolds seraient plus adaptables aux aléas chirurgicaux, en termes de taille et de forme. Ils présenteraient aussi l'avantage d'être plus faciles à ensemenecer et à manipuler. Expérimentalement, la perfusion de scaffolds granulaires par du milieu de culture a présenté des effets positifs sur la prolifération cellulaire [DAV11, YEA11a, YEA11b, ORR08] et sur l'ostéogénèse : augmentation des marqueurs de formation osseuse [DAV11, YEA11^a], minéralisation [DAV11, YEA11a, YEA11b], ... Cependant, jusqu'à maintenant et à notre connaissance, le cisaillement à la paroi des particules dans un scaffold granulaire n'a jamais été examiné en simulations numériques tridimensionnelles.

Dans ce chapitre, un bioréacteur en colonne composé d'un cylindre vertical rempli de particules granulaires a été étudié. Trois types d'empilements granulaires ont été analysés : un empilement de cubes (précédemment étudié expérimentalement dans le travail de David *et al.*, [DAV11]), un empilement de billes pour analyser l'effet de la géométrie et un empilement bidisperse de billes pour analyser l'effet de la porosité. Dans ce but, une méthode de dynamique des fluides numérique en trois dimensions a été développée pour simuler le flux au sein du bioréacteur en colonne. L'objectif a été de déterminer numériquement les niveaux et distributions du cisaillement à la paroi de ces scaffolds et de comparer ces résultats avec ceux des scaffolds poreux massifs, décrits dans la littérature. D'un point de vue biologique, mes résultats de cette étude numérique présentent une étape clé dans l'optimisation du microenvironnement mécanique des cellules dans des cultures dynamiques 3D. Les

distributions de vitesse du fluide et de cisaillement aux parois des particules ont été analysées en fonction du flux d'entrée et de la géométrie des particules. L'efficacité mécanique du flux a été évaluée et la dispersion des valeurs de cisaillement a été comparée avec la fonction gamma à 3 paramètres proposée par Voronov *et al* [VOR10^b].

2. Matériels and méthodes

Le but de cette étude est de déterminer le niveau de contrainte mécanique perçue par les cellules dans un bioréacteur en colonne d'ingénierie tissulaire osseuse [DAV11] composé d'un tube vertical de Plexiglas[®] de 13.1 mm de diamètre et rempli de particules de corail. Dans ce bioréacteur, les cellules sontensemencées sur la surface des particules et un flux continu unidirectionnel de milieu de culture alpha-MEM est imposé.

2.1 Génération des empilements granulaires

La simulation du flux dans un bioréacteur nécessite une connaissance précise de la géométrie du scaffold composé ici de différents empilements de particules. Dans ce travail, trois types de particules ont été utilisés :

- Des cubes de 3 mm de côté
- Des billes de 2 mm de diamètre
- Des billes de 3.5 mm de diamètre

Dans chaque cas, les particules ont été considérées comme parfaites d'un point de vue géométrique et suffisamment grandes par rapport à la taille typique d'une cellule pour pouvoir supposer un attachement plat des cellules. Trois empilements de particules cubiques et sphériques ont été générés à partir de ces particules. Les trois configurations sont composées de :

- Ccube : 51 cubes de 3 mm de côté
- C1bille : 71 billes de 3.5 mm de diamètre
- C2bille : 36 billes de 3.5 mm de diamètre et 108 billes de 2 mm de diamètre

Dans Ccube, le nombre de particules a été déterminé par rapport à un volume représentatif d'un empilement de particules correspondant à un défaut de 15 mm de hauteur. Pour les autres configurations, le nombre de particules a été choisi afin d'avoir la même surface spécifique, environ 2740 mm², fournissant ainsi la même surface disponible pour l'attachement cellulaire. Pour créer ces empilements granulaires, les particules ont été choisies au hasard une par une et laissées tomber sous l'effet de la gravité dans un tube représentant le bioréacteur cylindrique. Cette procédure numérique reproduit de manière réaliste les conditions expérimentales de remplissage du bioréacteur. Dans ce but, le logiciel LMGC90 basé sur la méthode des éléments discrets a été utilisé. Ce logiciel a été principalement développé pour des simulations de matériaux granulaires et tous les détails de cette méthode de simulation peuvent être trouvés dans Jean *et al.* [JEA99] et Radjai *et al.* [RAD09]. Pour chaque configuration, quatre empilements aléatoires ont été générés menant ainsi à douze empilements granulaires étudiés dans ce travail. Un exemple de chaque configuration peut être visualisé sur la figure 1.

Comme la surface globale des empilements a été fixée égale pour toutes les configurations, la hauteur moyenne de C2bille (h=17.6 mm) est significativement plus faible que celle de Ccube (h=22.4 mm) et de C1bille (h=23.6 mm). La porosité, définie comme le rapport entre le volume de fluide sur le volume total de l'empilement, est de 54.2 %, 49.8 % et 46.9 % pour les configurations Ccube, C1bille et C2bille respectivement.

Grâce aux données de positions et d'orientations obtenues avec LMGC90, les douze configurations sont créées dans le modèle numérique puis maillées avec le logiciel Comsol

Multiphysics 3.4 (Comsol, Inc, USA). Les particules sont considérées comme fixes et indéformables. Dans tous les empilements granulaires, la même densité d'éléments à la surface des particules a été imposée à une valeur proche de 40 éléments triangulaires par mm². Cette densité avait été identifiée lors d'une étude de convergence préalable comme permettant à la fois des simulations précises et des temps de calcul raisonnables. Ensuite, le domaine du fluide composé du cylindre entier moins le volume des particules a été maillé avec des éléments tétraédriques tridimensionnels (tétraèdres à 10 nœuds, Lagrange P2-P1). Dans toutes les configurations, la densité moyenne de tétraèdres a été fixée à environ 200 tétraèdres par mm³.

2.2 Simulations de dynamique des fluides numérique

Dans toutes les simulations, le fluide a été considéré comme homogène, newtonien et incompressible avec une densité $\rho = 1000 \text{ kg/m}^3$ et une viscosité dynamique $\eta = 1.45 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$ [MIL09]. Le fluide suit un écoulement classique de Poiseuille à la limite inférieure et la vitesse suit donc une équation parabolique (Eq. III-1) :

$$v(r) = \frac{2\varphi}{\pi R^2} * \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \quad \text{Eq. III-1}$$

Où r est la position radiale de la particule de fluide considérée, φ est le flux entrant et R est le rayon du cylindre. Dans cette étude, 5 flux entrants différents ont été testés : 10 mL/min, 50 mL/min, 100 mL/min, 150 mL/min et 200 mL/min correspondant à une vitesse moyenne d'entrée de 1.2 mm/s, 6.2 mm/s, 12.4 mm/s, 18.5 mm/s et 24.7 mm/s respectivement. La limite supérieure est définie comme une frontière libre où seule la pression est imposée à la pression atmosphérique. Une condition classique de non glissement est utilisée sur toutes les autres limites à savoir les parois des particules et du tube. La simulation du flux en trois

dimensions à l'intérieur du bioréacteur revient à la résolution des équations de Navier-Stokes en analyse stationnaire.

2.3 Analyses des niveaux et distributions du cisaillement

Les résultats des simulations analysés sont la vitesse du fluide et le cisaillement aux parois des particules en termes de valeurs moyennes et de distributions. Les lignes de courant ont été tracées pour observer le comportement du fluide au travers des empilements de particules. Le cisaillement aux parois a été calculé en tous les nœuds de la surface des particules comme étant la projection du vecteur contrainte dans le plan perpendiculaire à la normale à la paroi, selon la formule suivante (Eq. III-2) :

$$\tau = |\vec{T} - (\vec{T} \cdot \vec{n})\vec{n}| \quad \text{Eq. III-2}$$

Où $\vec{T} = \sigma \cdot \vec{n}$ est le vecteur contrainte, \vec{n} est le vecteur normal à la surface et σ est le tenseur des contraintes de Cauchy donné par la loi de comportement classique pour un fluide newtonien incompressible et visqueux. Pour le calcul des moyennes et la détermination des distributions de contraintes, chaque valeur de cisaillement à la paroi a été pondérée par la taille locale du maillage correspondant. Les nombres de Reynolds calculés pour chaque configuration ont prouvé que l'on pouvait faire l'hypothèse d'un écoulement laminaire. Ceci a été confirmé par la suite par l'obtention d'une relation linéaire entre la vitesse d'entrée et le cisaillement moyen.

Les fonctions densité de probabilité (fdp) du cisaillement aux parois pour toutes les simulations CFD ont aussi été générées. Les valeurs de cisaillement ont préalablement été normalisées suivant l'équation (Eq. III-3) :

$$\tau^* = \frac{\tau - \bar{\tau}}{\sigma_\tau} \quad \text{Eq. III-3}$$

où $\bar{\tau}$ est le cisaillement moyen à la paroi et σ_τ est l'écart-type de la distribution des contraintes de cisaillement. Les cisaillements adimensionnalisés ainsi obtenus sont ensuite classés du plus petit au plus grand et répartis dans 50 intervalles de taille égale grâce à Matlab. La fonction densité de probabilité gamma à 3 paramètres $\Gamma(2.91, -1.43, 0.45)$ définie par Voronov *et al.* [VOR10^b] a été comparée à ces fdp expérimentales.

2.4 Analyse de l'hétérogénéité

Une analyse d'hétérogénéité de la répartition des contraintes de cisaillement au sein de l'empilement a également été menée. En effet, dans le contexte de l'ingénierie tissulaire, il est nécessaire de créer des greffons homogènes en termes de concentration cellulaire ainsi qu'en termes de production éventuelle de matrice extra-cellulaire. Cela passe évidemment par une homogénéité des contraintes de cisaillement présentes au sein du bioréacteur.

Pour caractériser l'hétérogénéité verticale de la distribution des contraintes au sein des empilements, le modèle est discrétisé en 50 tranches (cf figure III-1.a). Pour chaque tranche, le cisaillement moyen est calculé. L'écart-type entre ces 50 valeurs est noté σ_τ^z . Le cisaillement moyen sur l'ensemble de l'empilement est noté $\bar{\tau}$. Pour comparer toutes les configurations, le paramètre hétérogénéité verticale H_z a été défini comme suit :

$$H_z = \frac{\sigma_\tau^z}{\bar{\tau}} \quad \text{Eq. III-4}$$

De la même manière, pour caractériser l'hétérogénéité radiale de la distribution des contraintes au sein des empilements, le modèle est discrétisé en 20 anneaux (cf figure III-1.b). Pour chaque anneau, le cisaillement moyen est calculé. L'écart-type entre ces 20 valeurs est

noté σ_τ^r . Le cisaillement moyen sur l'ensemble de l'empilement est noté $\bar{\tau}$. Pour comparer toutes les configurations, le paramètre hétérogénéité radiale H_r a été défini comme suit :

$$H_r = \frac{\sigma_\tau^r}{\bar{\tau}} \quad \text{Eq. III-5}$$

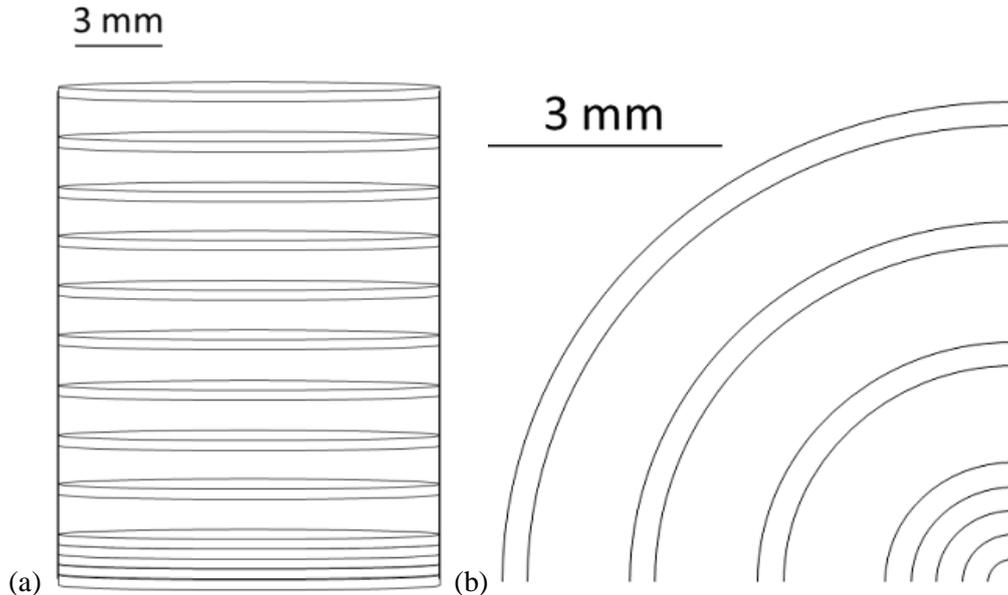


Figure III-1 : (a) Représentation schématique du modèle discrétisé en 50 tranches dans la direction verticale. (b) Représentation schématique du modèle discrétisé en 20 anneaux dans la direction radiale.

2.5 Analyse statistique

Pour chaque configuration et pour chaque flux, quatre empilements aléatoires ont été générés et analysés. Dans cette étude, la valeur moyenne correspond à la valeur moyenne entre les quatre simulations d'une même configuration, et les barres d'erreur présentées sur les graphes représentent plus ou moins un écart-type.

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel R (The R foundation) avec un seuil de significativité fixé à 5 % (risque alpha). Un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour détecter des différences significatives entre les configurations. Si au moins une

des configurations était détectée comme significativement différente des autres, un test *post-hoc* de Conover-Iman a été utilisé pour comparer les configurations deux à deux.

L'influence du flux entrant sur la valeur moyenne du cisaillement a été étudiée par des tests de corrélation de Spearman.

3. Résultats

3.1 Vitesse et lignes de courant

Un résultat typique de champ de vitesse 3D pour un empilement de chaque configuration est présenté figure III-2 à 200 mL/min. Les lignes colorées représentent les lignes de courant, leur couleur étant proportionnelle à la valeur de la norme du vecteur vitesse local.

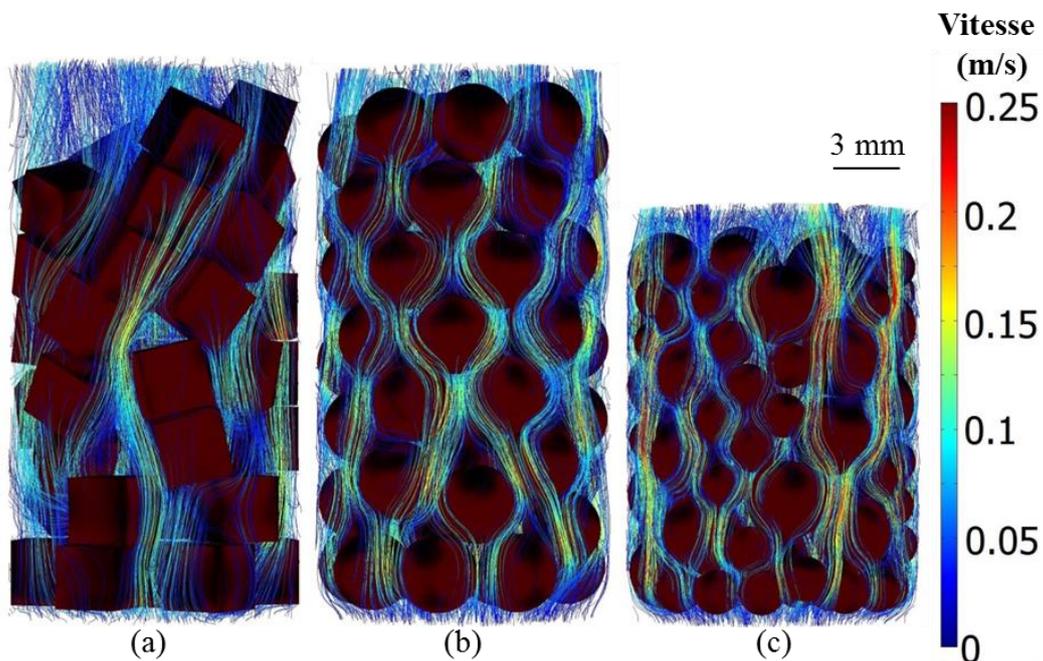


Figure III-2 : Lignes de courant obtenues pour un empilement de chaque configuration *Ccube* (a), *C1bille* (b) and *C2bille* (c) à 200 mL/min. La couleur des lignes représente la norme du vecteur vitesse local. Le fluide circule de bas en haut au sein de l'empilement.

Les valeurs moyennes de vitesse sont de 0.045, 0.053 et 0.054 m/s pour Cube, C1bille et C2bille respectivement. Ces valeurs peuvent être comparées à la vitesse moyenne en entrée de

0.025 m/s. Les niveaux les plus élevés de vitesse sont obtenus dans la configuration C2bille.

Les niveaux de vitesse de fluide au sein des empilements sont donc dépendants de la géométrie et de l'organisation spatiale des particules.

3.2 Niveaux de cisaillement

Le cisaillement aux parois des particules est présenté sur la figure III-3 pour un empilement de chaque configuration et pour chaque flux entrant testé. Pour un même flux, le cisaillement augmente en passant de Ccube à C1bille et de C1bille à C2bille. Comme attendu, le cisaillement augmente aussi lorsque le flux d'entrée augmente, pour une même configuration. Au sein d'un empilement, la localisation du cisaillement maximal est similaire quel que soit le flux d'entrée.

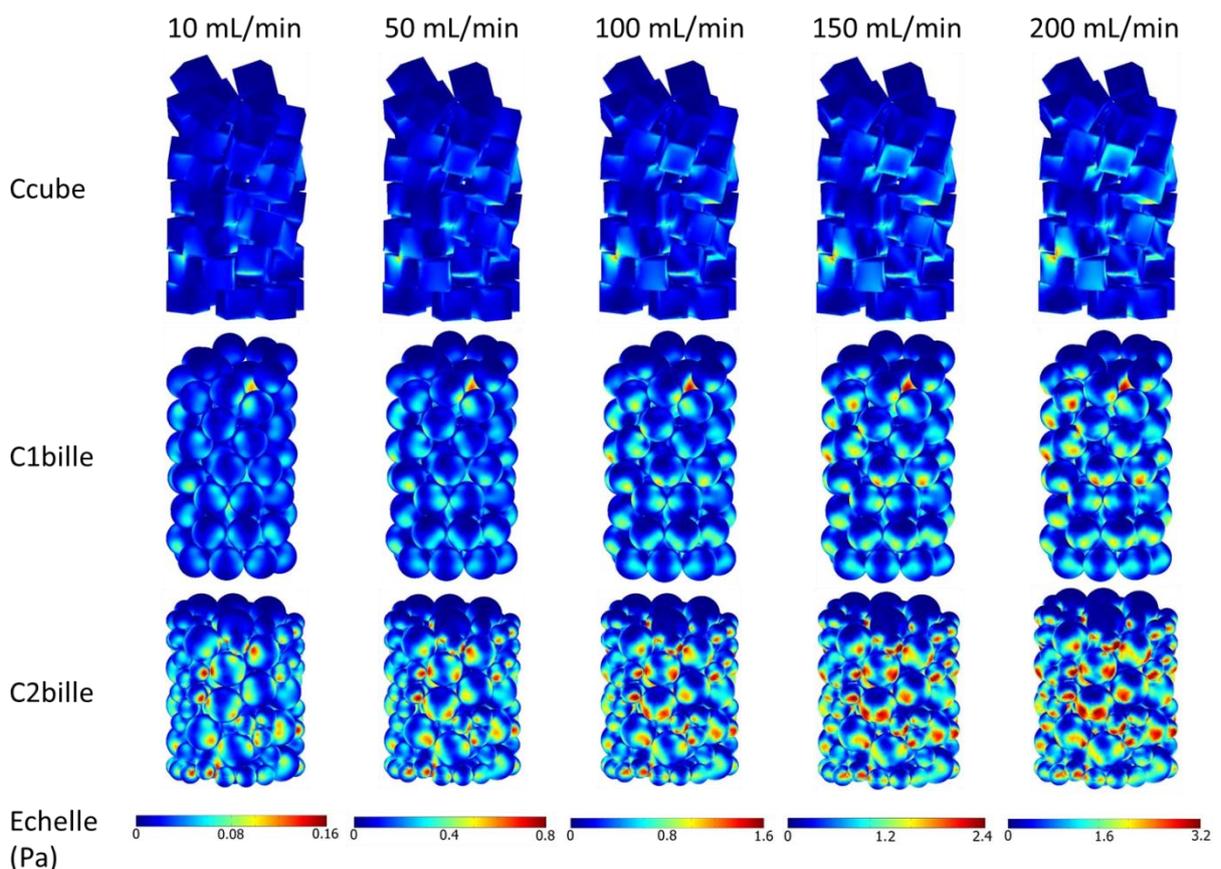


Figure III-3 : Cisaillement aux parois obtenu pour un empilement de chaque configuration Ccube, C1bille and C2bille à chaque flux d'entrée. Le fluide circule de bas en haut à travers l'empilement.

La figure III-4 présente le cisaillement moyen en fonction du flux d'entrée pour chaque configuration. Chaque barre correspond à la valeur moyenne des quatre simulations sur les quatre empilements de chaque configuration, avec l'écart-type associé.

Comme attendu, le cisaillement moyen augmente avec le flux d'entrée. Dans la gamme de flux d'entrée considérés, la relation entre le cisaillement moyen à la paroi et le flux d'entrée est linéaire, ce qui valide l'hypothèse d'un écoulement laminaire. Les pentes valent 16.1 Pa.s.m^{-1} ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.995$), 27.5 Pa.s.m^{-1} ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.995$) et 38.6 Pa.s.m^{-1} ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.998$) pour Ccube, C1bille et C2bille respectivement. L'efficacité mécanique du flux d'entrée obtenu à travers cette pente dépend fortement de la configuration. Pour un même flux, le cisaillement moyen aux parois augmente de 70% en passant de Ccube à C1bille et encore de 40% en passant de C1bille à C2bille.

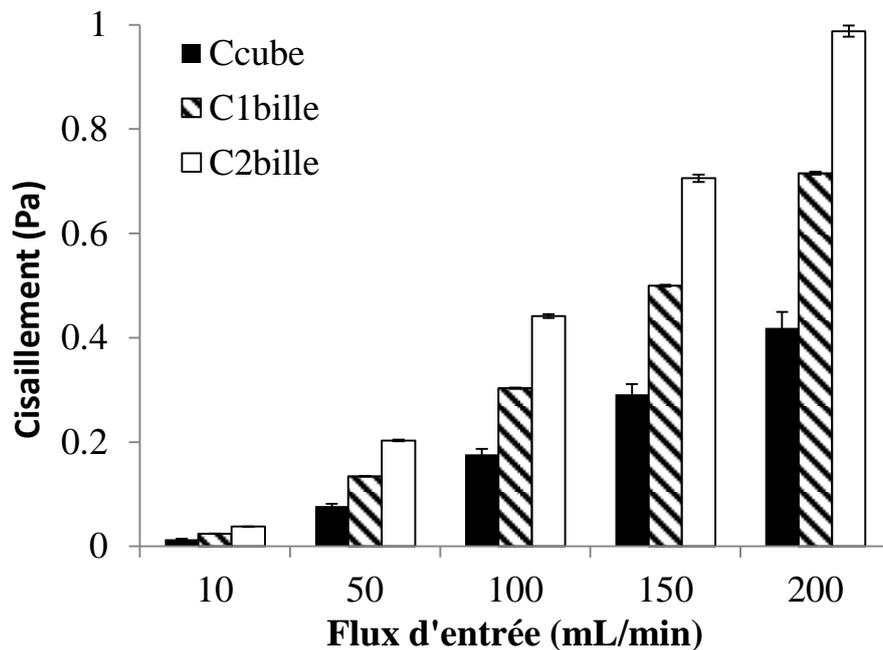


Figure III-4 : Cisaillement moyen aux parois pour les configurations Ccube, C1bille et C2bille à 10 mL/min, 50 mL/min, 100 mL/min, 150 mL/min et 200 mL/min. Chaque barre représente la valeur moyenne calculée pour les quatre empilements de chaque configuration.

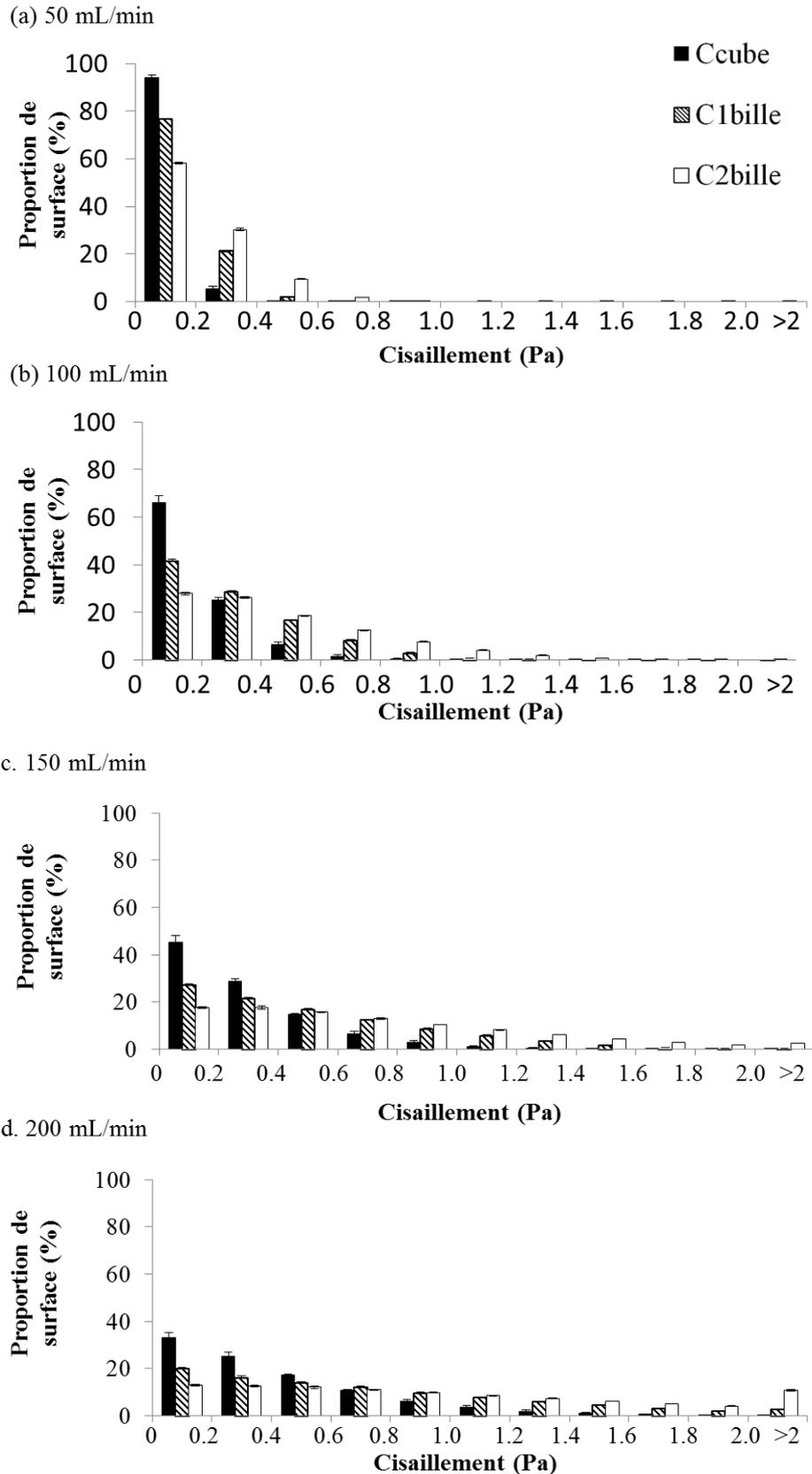


Figure III-5 : Distribution du cisaillement aux parois pour les configurations Ccube, C1bille et C2bille à 50 mL/min (a), 100 mL/min (b), 150 mL/min (c) et 200 mL/min (d). Chaque barre représente la valeur moyenne des quatre empilements pour chaque configuration.

3.3 Distributions de cisaillement

A l'échelle locale, le flux entrant joue un rôle important sur la répartition du cisaillement appliqué à la surface des particules. Les distributions sont présentés figure III-5, chaque barre correspondant à la valeur moyenne des quatre simulations pour les quatre empilements de chaque configuration, avec l'écart-type associé. La distribution pour un flux entrant de 10 mL/min n'est pas présentée parce que 100 % des valeurs de cisaillement sont comprises dans le premier intervalle [0-0.2 Pa] pour toutes les configurations. Comme attendu, le cisaillement local augmente avec le flux d'entrée. Pour chaque flux, la distribution de C2bille était plus étalée sur la droite vers les cisaillements élevés que celles de Ccube et de C1bille.

3.4 Analyse de la dispersion locale

Les fonctions densité de probabilité (fdp) obtenues pour les trois géométries de cette étude sont présentées figure III-6. Les 1000 points correspondant aux 50 points des quatre empilements et pour les cinq flux d'entrée sont présentés sur un même graphe. Les trois fdp obtenues ont une forme de fonction gamma à 3 paramètres. Plus précisément, Ccube et C1bille présentent des fréquences élevées pour les cisaillements faibles, créant un pic élevé et étroit sur la gauche. Ce pic est plus élevé dans Ccube (0.83) que dans C1bille (0.67). La fdp de C2bille est plus large avec une valeur maximale plus faible (0.53) et une traîne plus allongée vers les cisaillements les plus élevés. La ligne pointillée sur chaque graphe représente la fdp $\Gamma(2.91,-1.43,0.45)$ définie par Voronov *et al.* [VOR10^b]. Dans le présent travail, un test de Kolmogorov-Smirnov a montré que les fdp de toutes les configurations de cette étude suivaient la distribution gamma à trois paramètres $\Gamma(2.91,-1.43,0.45)$ de Voronov avec un niveau de significativité de 25 à 30%.

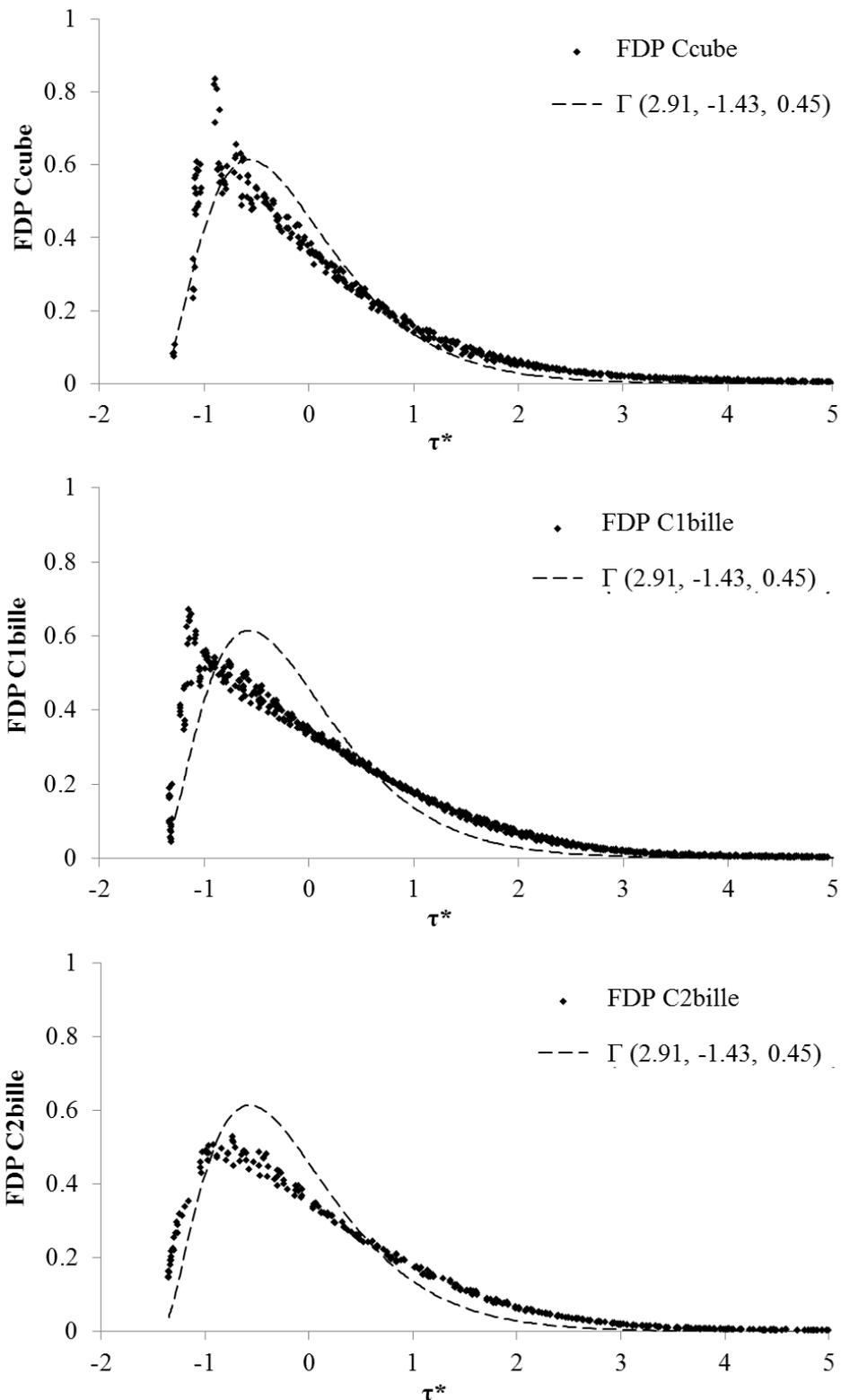


Figure III-6 : Fonctions densité de probabilité du cisaillement aux parois adimensionnalisés pour Ccube (a), C1bille (b) et C2bille (c). 50 points ont été créés pour chaque calcul résultant en un total de 1000 points par configuration. La ligne pointillée représente la distribution gamma obtenue par Voronov et al. [VOR10^b]: $\Gamma(2.91, -1.43, 0.45)$.

3.5 Analyse de l'hétérogénéité du cisaillement

Les différences entre les valeurs d'hétérogénéité verticale ne sont pas significatives entre les différentes configurations. Par exemple, à 200 mL/min, les hétérogénéités verticales calculées sont de 34.1%, 30.7% et 31.6% pour Ccube, C1bille et C2bille respectivement.

Les valeurs des hétérogénéités radiales calculées pour toutes les configurations et tous les flux sont présentées figure III-7. Pour chaque flux, Hr est de l'ordre de 15% pour C2bille, plus faible que dans les deux autres configurations (20 à 30%). Pour toutes les configurations, Hr décroît légèrement lorsque le flux d'entrée augmente.

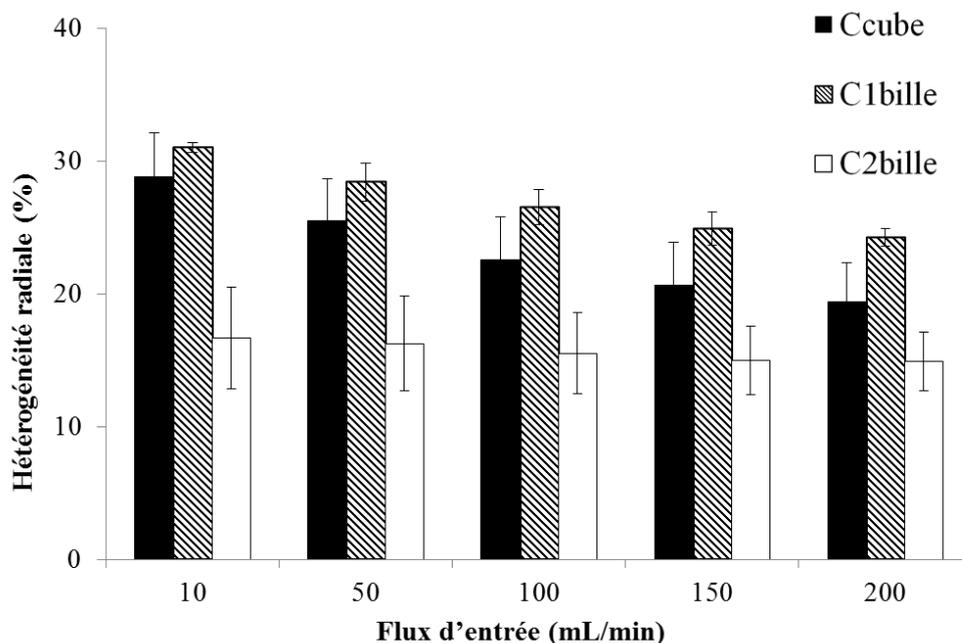


Figure III-7: Hétérogénéité radiale obtenue pour les quatre empilements des configurations Cube, C1bille et C2bille à 10 mL/min, 50 mL/min, 100 mL/min, 150 mL/min et 200 mL/min. Chaque barre représente la valeur moyenne calculée pour les quatre empilements de chaque configuration.

4. Discussion et conclusion

Dans cette étude, trois scaffolds poreux faits de particules cubiques ou sphériques de taille millimétrique ont été étudiés. Les cisaillements locaux ont été calculés par CFD pour ces trois

types d'empilements granulaires. La présente étude numérique tridimensionnelle sur le cisaillement au sein de scaffolds granulaires a mis en évidence des pistes intéressantes pour le futur développement de tels scaffolds. La géométrie des particules influence fortement la vitesse du fluide, les niveaux et les distributions de cisaillement, l'efficacité mécanique du flux et joue un rôle sur l'homogénéité des cisaillements au sein du scaffold.

Comme attendu pour chaque empilement, une relation linéaire a été établie entre le cisaillement moyen à la paroi et la vitesse moyenne à l'entrée du dispositif. La pente de cette relation linéaire, notée S_w dans la suite de cette étude, représente la capacité du scaffold à convertir l'effet du flux de milieu de culture en une stimulation mécanique à l'échelle cellulaire. Le tableau III-1 donne les pentes S_w obtenues pour les scaffolds étudiés dans ce travail ainsi que différents scaffolds analysés dans la littérature. Dans cette étude, S_w est fortement dépendant de la géométrie du scaffold et de la distribution des tailles de particules. En particulier, la pente de la configuration C2bille est deux fois plus grande que la valeur obtenue pour la configuration Ccube.

Référence	Type de scaffold	Porosité (%)	Diamètre de pore moyen (μm)	Pente S_w (Pa.s/m)
Zermatten <i>et al.</i> [ZER14]	Mousse - SF	55.5	160	56
Zermatten <i>et al.</i> [ZER14]	Mousse - PCL	37.9	220	46
Maes <i>et al.</i> [MAE12]	Mousse – Ha	73	270	41
Maes <i>et al.</i> [MAE12]	Mousse – Ti	77	280	32
McCoy <i>et al.</i> [MCC12]	Mousse – CG	90	85-325	75
VanGordon <i>et al.</i> [VAN11]	Mousse – PLA	85	271	79
Lesman <i>et al.</i> [LES10]	Mousse – PLA	90	500	30
Lesman <i>et al.</i> [LES10]	Mousse – PLA	90	150	105
Milan <i>et al.</i> [MIL09]	Mousse –PLA	90	-	30
Jungreuthmayer <i>et al.</i> [JUN09 ^b]	Mousse – CG	90.5	96	80
Jungreuthmayer <i>et al.</i> [JUN09 ^b]	Mousse – CaPo	58.5	350	29
Cioffi <i>et al.</i> [CIO06]	Mousse – PEGT	80	180	25
Cioffi <i>et al.</i> [CIO08]	Mousse - Degrapo	77	100	68
Boschetti <i>et al.</i> [BOS06]	Mousse – PLA	77	100	78
Ccube	Empilement de cubes	54.2	-	16
C1bille	Empilement de billes	49.8	-	28
C2bille	Empilement de billes	46.4	-	39
VanGordon <i>et al.</i> [VAN11]	Fibres	85	-	79
Raimondi <i>et al.</i> [RAI02]	Fibres	-	-	67

Tableau III-1 : Porosité, taille des pores et pentes S_w obtenues pour différents scaffolds de la littérature et de cette étude.

Dans la littérature, de nombreuses études portent sur les mousses poreuses utilisées comme scaffolds. Ces mousses sont composées de différents matériaux, avec une porosité variant de 38 à 90% et un diamètre de pores de 100 à 500 μm . Bien que très dispersées, toutes ces mousses donnent le même ordre de grandeur de la pente S_w avec une valeur moyenne d'environ 50 $\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$. Goldstein *et al.* [GOL01] ont proposé un modèle simplifié de pores cylindriques pour donner une évaluation analytique de cette pente, inversement proportionnelle au diamètre de pore et à la porosité. Cette formule prédit grossièrement la variation observée dans les différentes configurations. Les simulations sur des scaffolds de type « réseaux de fibres » sont plus rares mais deux études référencées dans le tableau présentent une pente légèrement plus élevée que celle obtenue pour les mousses.

Les pentes des empilements granulaires de ce travail sont plus faibles que celles trouvées dans la littérature mais restent toutefois du même ordre de grandeur. Ces variations ne peuvent pas être expliquées par la faible diminution de porosité observée dans les configurations granulaires, ce qui suggère un effet important de la taille des espaces vides entre les particules. La morphologie typique des empilements granulaires rend impossible la définition d'un diamètre moyen des pores. Cependant, on peut noter que l'espace vide a été réduit lorsque le nombre de particules et le nombre de leurs points de contacts a été augmenté au sein d'une même fraction volumique, en passant par exemple de C1bille à C2bille, qui présente une pente nettement plus élevée. Ce résultat suggère que la pente des empilements granulaires pourrait être améliorée en utilisant une distribution plus large de taille de particules, ou bien des particules plus petites. Toutefois, il est à noter que la taille des particules gouverne la vitesse de dissolution du greffon et doit être supérieure à un certain seuil, dépendant de la vitesse de création d'os nouveau.

Récemment, Voronov *et al.* [VOR10^b] ont développé une nouvelle méthode basée sur les fonctions densité de probabilité pour évaluer a priori la distribution de contraintes au sein de

scaffolds poreux. En particulier, ces auteurs ont montré que la fonction densité de probabilité gamma à 3 paramètres $\Gamma(2.91,-1.43,0.45)$ est suivie par les fdp de contraintes obtenues pour 36 scaffolds extrêmement poreux fabriqués sur place et a été validée pour d'autres mousses poreuses d'autres laboratoires [CIO06, MAE12, JUN09^b]. Cette nouvelle méthode a également été validée sur les empilements granulaires utilisés dans cette étude montrant que les fdp de toutes les configurations suivent cette même distribution gamma 3p.

Cette étude a montré que les scaffolds granulaires suivent la même fdp que les scaffolds poreux massifs. Dans Ccube et C1bille, un pic à haute fréquence est observé proche du cisaillement normalisé -1 suggérant une architecture plus ordonnée, d'après les travaux de Pham *et al.* [PHA12]. Jusqu'à aujourd'hui à notre connaissance, c'est la seule étude portant sur les fdp de cisaillement aux parois dans des scaffolds de porosité de l'ordre de 45 à 55%. Dans ce travail les auteurs ont trouvé que pour les configurations les plus aléatoires et avec une porosité inférieure à 60%, les fdp suivaient toujours la distribution gamma à 3 paramètres mais avec une modification de forme : un pic à haute fréquence proche du cisaillement normalisé -1 est apparu, la décroissance généralement observée à la gauche de ce pic a disparu et l'effet était plus prononcé avec une porosité plus faible. D'après ces résultats, l'absence de pic dans la configuration C2bille révèle, comme attendu, une géométrie plus aléatoire et suggère que d'autres distributions de tailles de billes conduisant à une plus faible porosité pourraient être acceptable.

L'analyse d'hétérogénéité a montré que la configuration C2bille fournit un cisaillement plus homogène au sein des empilements que les deux autres configurations. Il est probable que l'ajout de petites billes dans C2bille par rapport à C1bille a réduit et homogénéisé la taille et la forme des pores dans l'empilement et par conséquent a considérablement réduit l'hétérogénéité des contraintes. Ceci est très important du point de vue de la conception de

bioréacteurs car l'homogénéité des contraintes est directement liée avec l'homogénéité de l'adhérence cellulaire et de la production de matrice extracellulaire.

Dans cette étude, la géométrie initiale du modèle a été créée par une méthode d'éléments discrets consistant en des particules prélevées aléatoirement une par une parmi une bibliothèque de particules définies. Cette procédure originale est rapide et facile à implémenter par rapport à une approche par microtomographie. Une limitation de la méthode de cette étude dérive des caractéristiques parfaites des particules et de l'absence de rugosité à la surface des particules. Cependant, à notre connaissance, l'effet sur le cisaillement à la paroi d'une rugosité submicrométrique n'a jamais été analysé dans les différentes simulations sur scaffolds poreux en raison de la limite imposée par la résolution de la microtomographie. Prendre en compte la rugosité n'était pas dans les objectifs de cette étude mais créer un ensemble de particules rugueuses à la place des particules parfaitement lisses est techniquement réalisable.

Dans les scaffolds poreux 3D, les effets bénéfiques du flux ont été observés et reportés dans la littérature pour des cisaillements allant de 10^{-5} à 10^{-2} Pa. La prolifération cellulaire, la production de matrice extracellulaire, l'activation de protéines et l'expression de certains gènes liés à la mécanotransduction ont été fréquemment rapportés dans la littérature avec ces niveaux de cisaillement [TAN05, LIU12, SIK03, SIK05, ZHA07]. Dans l'étude présente, de tels niveaux de contraintes ont été atteints dès 10 mL/min pour toutes les configurations. Cependant, ce niveau de stimulation est assez différent des valeurs de cisaillement *in vivo* de 0.8 à 3 Pa [WEI94] ou dans des expériences bidimensionnelles sur des cultures en monocouche allant de 0.3 à 2 Pa [GRE09, KLE98, LI04]. Le dispositif étudié dans ce travail, un bioréacteur en colonne rempli d'un scaffold granulaire, permet d'atteindre des niveaux de stimulation de cet ordre de grandeur. Les flux d'entrée élevés requis pour atteindre ces niveaux indiquent cependant qu'il faut prévoir des expériences à flux intermittent. Un

chargement mécanique discontinu composé de séquences alternées de faibles flux et de flux élevés serait comparable à un chargement connu *in vivo*, avec des phases alternées d'activité et de repos.

En conclusion, les scaffolds composés d'empilements granulaires sont équivalents en termes d'efficacité mécanique du flux et de distribution des contraintes, et seraient plus adaptés à un contexte chirurgical. La configuration C2bille est la meilleure des trois testées dans ce travail en termes d'efficacité mais aussi d'homogénéité. La méthode numérique proposée ici pourrait être directement appliquée à d'autres distributions de particules pour optimiser les scaffolds par rapport à ces critères de niveau, de répartition et d'homogénéité des contraintes. Dans un prochain chapitre, les effets des différentes configurations de ce travail seront étudiés expérimentalement et leurs effets sur la prolifération cellulaire, les marqueurs de formation osseuse et la minéralisation seront analysés.

Chapitre IV

Mise en œuvre expérimentale des résultats numériques :
Cultures en bioréacteurs sur différents types d'empilements granulaires

Résumé

En ingénierie tissulaire osseuse, des bioréacteurs à perfusion ont d'abord été développés de manière à assurer un meilleur transport de masse. Le flux de milieu de culture crée aussi des contraintes au sein des bioréacteurs, qui ont une action sur le métabolisme cellulaire. Les scaffolds les plus répandus en ingénierie tissulaire osseuse sont des scaffolds massifs poreux mais récemment des scaffolds granulaires ont commencé à être étudiés. Ceux-ci ont contribué à de bons résultats en termes de viabilité et de prolifération cellulaire, de production de matrice extracellulaire et d'ostéoformation.

Dans ce chapitre, trois configurations géométriques différentes de scaffolds granulaires ont été testées expérimentalement dans un bioréacteur en colonne. Des cellules souches mésenchymateuses humaines ont étéensemencées sur des particules de corail de taille millimétrique dont l'empilement forme un scaffold granulaire. Les effets à court terme d'un flux continu à 10 mL/min et d'une séquence de stimulation alternant des phases de flux élevé à 150 mL/min et de flux faible à 10 mL/min ont été analysés et comparés. Les résultats obtenus permettent la comparaison des différentes configurations géométriques envisagées pour un même flux, et l'évolution de la réponse cellulaire en fonction du niveau de stimulation appliqué.

1. Introduction

Si dès les années 1990, les bioréacteurs ont été utilisés avec des scaffolds poreux, ce n'est que depuis une dizaine d'années que des scaffolds granulaires ont commencé à être utilisés et étudiés. Ces scaffolds présentent des avantages quant à leur ensemencement, notamment si de grands volumes sont requis, et permettent par leur modularité de remplir des défauts de toute forme et de toute taille. Le tableau IV-1 répertorie les travaux qui ont étudié expérimentalement ces scaffolds ainsi que les résultats obtenus.

Référence	Matériau (dimension en mm)	Espèce	Bioréacteur, flux, durée	Effet observé
Janssen <i>et al.</i> [JAN06]	HA/TCP (2-6)	chèvre	Bioréacteur à perfusion, 4 mL/min, 19 jours	Prolifération cellulaire, production de matrice extracellulaire in vitro Formation osseuse in vivo (implantation en sous cutané chez la souris nude)
Viateau <i>et al.</i> [VIA07]	Corail Porites (3)	brebis	Spinner flask, 20 rotations/min, 10 jours	Formation osseuse in vivo (implantation dans un défaut métatarsien de brebis)
Orr <i>et al.</i> [ORR08]	PLLA (0.8)	souris	Bioréacteur à perfusion, 4.8 mL/min + compression 330 kPa, 28 jours	Prolifération cellulaire
David <i>et al.</i> [DAV11]	Corail Acropora Florida (3)	brebis	Bioréacteur à perfusion, 10 mL/min, 21 jours	Prolifération cellulaire, production de matrice extracellulaire in vitro Formation osseuse in vivo (implantation en sous cutané chez la brebis)
Yeatts <i>et al.</i> [YEA11 ^a]	Alginate (4)	humain	Bioréacteur à perfusion, 3 ou 10 mL/min, 28 jours	Prolifération, augmentation de l'expression de gènes (ALP, OPN, OCN, BMP2), production de matrice extracellulaire

Tableau IV-1 : Etudes expérimentales portant sur des cultures de cellules souches mésenchymateuses de différentes espèces ensemencées sur des scaffolds granulaires et effet de la perfusion.

Ces études ont duré de 10 à 28 jours, les cellules utilisées sont des cellules souches mésenchymateuses dans tous les cas, de différentes espèces. Les matériaux constituant les scaffolds sont divers et les particules étudiées sont de taille millimétrique. Dans tous les cas, la viabilité cellulaire était bonne et une prolifération cellulaire était observée. Une production de matrice extracellulaire a été observée dans toutes les études où ce paramètre a été analysé. L'étude de Yeatts *et al.* [YEA11^a] a réalisé une analyse génique et a révélé la surexpression

de gènes liés à l'ostéoformation : ALP, OPN, OCN et BMP2. Une ostéoformation *in vivo* a été observée dans les 3 cas où une implantation a été réalisée. Les cisaillements appliqués sont évalués à 0.07 Pa dans les travaux d'Orr *et al.* [ORR08], à 0.1 et 0.3 Pa dans les travaux de Yeatts *et al.* [YEA11^a].

Ces niveaux de cisaillement ont été calculés d'après les valeurs expérimentales de flux mais n'ont pas fait l'objet d'une étude d'optimisation de la mécanostimulation des cellules. Ils sont inférieurs à ceux identifiés comme efficaces dans les cultures 2D sur polystyrène de cellules souches mésenchymateuses des expériences du chapitre II (0.7 Pa) et cohérents avec les données de la littérature (0.7 - 1.2 Pa) [KLE98, LI04, GRE09]. De la même manière, les niveaux de cisaillement *in vivo* sont compris entre 0.8 et 3 Pa [WEI94]. L'étude numérique du chapitre III a montré que ces niveaux de stimulation pouvaient être atteints avec des scaffolds granulaires. Un niveau moyen de 0.7 Pa est notamment atteint grâce à la configuration C2bille à 150 mL/min.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer les effets à court terme de la géométrie, en mettant en œuvre les 3 configurations testées numériquement dans le chapitre III et du flux : un flux faible de 10 mL/min et un flux élevé de 150 mL/min. La réponse des cellules est évaluée en mesurant, à court terme, l'expression de plusieurs gènes mécanosensibles. Ces expériences permettront de savoir si les niveaux de cisaillement efficaces en cultures bidimensionnelles le sont aussi dans un environnement tridimensionnel.

2. Matériels et méthodes

2.1 Bioréacteur et scaffolds

Le bioréacteur utilisé est composé d'un tube de Plexiglass® vertical d'environ 15 cm de hauteur et de 13.1 mm de diamètre intérieur. Il est percé à ses deux extrémités pour permettre la perfusion de milieu de culture. En bas du tube, une petite grille permet l'homogénéisation du flux et sert de base aux empilements de particules de biomatériaux. L'ensemble est stérilisable à l'autoclave. Le biomatériau utilisé dans cette étude est le corail Porites, avec une porosité de 49% et un diamètre moyen de pores de 250 μm , composé à 99% de carbonate de calcium. Il est fourni sous forme de billes ou de cubes stérilisés comme présenté sur la figure IV-1 (Biocoral, France).



Figure IV-1 : Particules cubiques et sphériques de corail Porites

Dans ce travail, trois types de particules ont été utilisés : des cubes d'environ 3 mm de côté, des billes d'environ 2 mm de diamètre et des billes d'environ 3.5 mm de diamètre. Trois types d'empilements ont été créés à partir de ces particules, présentant les mêmes caractéristiques que les empilements de particules du chapitre III. Ces trois configurations expérimentales sont composées de :

- Ccube^{exp} : cubes de 3 mm de côté
- C1bille^{exp} : billes de 3.5 mm de diamètre
- C2bille^{exp} : billes de 3.5 mm de diamètre (1/4) et de 2 mm de diamètre (3/4).

2.2 Préparation et ensemencement des cellules

Les cellules utilisées dans cette étude sont des cellules souches mésenchymateuses issues d'un prélèvement de moelle osseuse sur déchets opératoire issus d'un patient âgé de 16 ans (mêmes cellules que pour l'analyse de la production de NO dans le chapitre II). Pour cette expérience, les cellules ont été mises en culture pendant plusieurs jours afin d'en obtenir un nombre suffisant pour ensemercer tous les biomatériaux à hauteur de 1.5×10^6 cellules/cm². Le jour de l'ensemencement, les cellules sont décollées puis mises en suspension dans du milieu α -MEM-10%-SVF. Les particules de corail sont ensuite plongées dans cette suspension dans un tube à centrifuger de 50 mL, positionné en position semi-allongée. Pendant la première heure, le tube est tourné de 90° toutes les 15 minutes pour s'assurer que les particules soient ensemençées de manière homogène. Les cellules sont laissées au repos toute la nuit pour permettre l'adhérence. L'ensemencement peut être contrôlé sur quelques particules en utilisant une coloration « green fluorescent protein » (GFP) des cellules, comme présenté sur la figure IV-2.

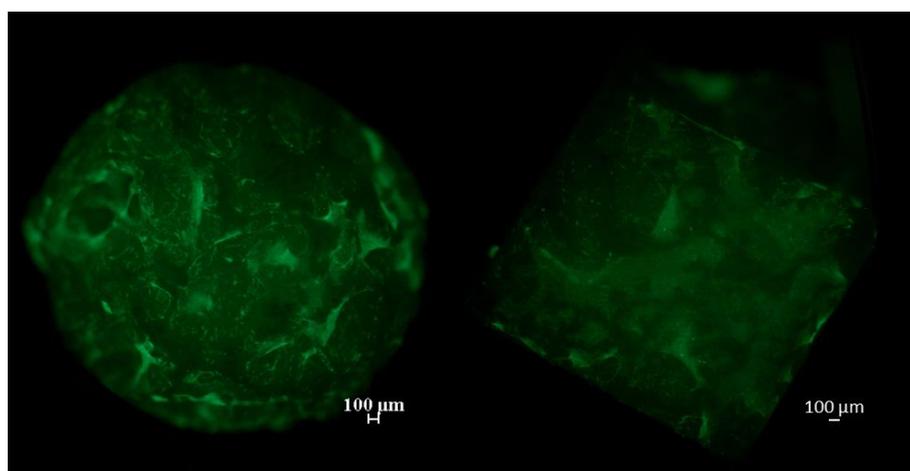


Figure IV-2 : Bille et cube de corail *Porites* ensemençés de cellules souches mésenchymateuses colorées « GFP » et observés au microscope à fluorescence. La couleur verte observée indique que l'ensemble de la surface des particules est bien couverte de cellules.

2.3 Expériences de flux en bioréacteur

Les bioréacteurs sont remplis pour créer les configurations Ccube^{exp}, C1bille^{exp} et C2bille^{exp} décrites ci-dessus. Les particules sont prélevées de manière aléatoire. Pour l'empilement C2bille^{exp}, on met alternativement 1 grande bille et 3 petites billes et ainsi de suite, de manière à avoir une répartition équilibrée des petites billes sur toute la hauteur de l'empilement. Les bioréacteurs sont perfusés par un système de tubulures lié avec un flacon réservoir de milieu de culture et une pompe péristaltique (Masterflex[®] L/S, Cole-Parmer, USA) permettant de délivrer un flux de 10 mL/min ou de 150 mL/min (cf figure IV-3). Différents régimes de flux ont été testés et dans chaque expérience, le cas contrôle est la configuration C2bille^{exp} en statique. Les résultats du chapitre III ont montré que la couche inférieure et la couche supérieure de particules au sein des empilements connaissent un cisaillement moins élevé que dans les autres couches. Ainsi dans les expériences de ce chapitre, une couche (nonensemencée) de billes de verre de diamètre 3.5 mm a été disposée en-dessous et au-dessus de chaque empilement de particules de corail, de manière à éviter les effets de bord.



Figure IV-3 : Bioréacteurs pendant une expérience de flux, avec les pompes péristaltiques, le système de tubulure et le réservoir de milieu de culture.

2.4 Analyse de l'expression génique

Après la fin des expériences, les bioréacteurs sont ouverts sous hotte et les particules sont retirées et placées dans du TRIzol[®] (Invitrogen, France). L'expression relative des gènes est mesurée par RT-PCR. Toutes les PCR sont effectuées en triplicatas. Les gènes testés dans le cadre des expériences de ce chapitre sont : PTGS2, IER3, EGR1, FGF2, IGF1, VEGFA, IGFBP1, RUNX2, ITGB1, HIF1A et ALP. Le rôle de ces gènes a déjà été détaillé dans le chapitre II. L'hétérogénéité intra-bioréacteur a été évaluée en prélevant des particules issues d'un même bioréacteur pour réaliser deux échantillons différents. Les particules ont alors été prélevées de manière aléatoire dans l'empilement. Ainsi les barres d'erreur présentées sur certains graphes de ce chapitre correspondent à l'écart-type entre ces deux valeurs obtenues.

3. Résultats

3.1 Ciblage des gènes activés

Dans un premier temps, une analyse génique a été réalisée sur un grand nombre de gènes pour déterminer quels gènes répondaient à la stimulation mécanique induite par le flux dans le bioréacteur. Cette expérience a été menée sur la configuration C2bille^{exp} (composé de 12 grandes billes et 36 petites billes) qui, pour un flux donné, donne le niveau de stimulation le plus élevé par rapport aux deux autres configurations. Le cas stimulé correspond à la configuration C2bille^{exp} soumise à une séquence alternant 3 fois un flux de 150 mL/min pendant 30 minutes et un flux de 10 mL/min pendant 60 minutes (notée 3*150mL/min dans la suite). L'expérience dure donc en tout 3h30min. Cette séquence a été imaginée de manière à apporter une importante stimulation mécanique aux cellules, mais de façon intermittente, pour éviter un éventuel décollement dû à une exposition prolongée à un cisaillement élevé. Cette

notion de sollicitation intermittente des cellules a également été suggérée par Vance *et al.* [VAN05]. Les résultats de l'analyse génique sont présentés figure IV-4.

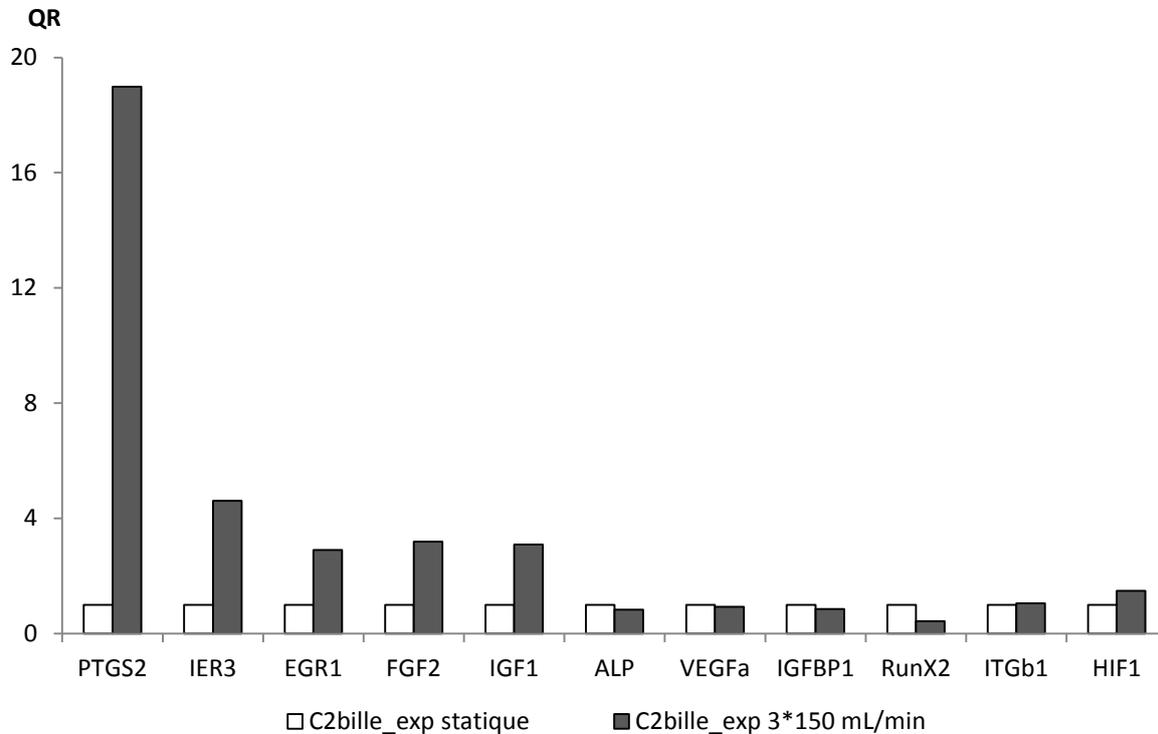


Figure IV-4 : Expression relative des gènes mécanosensibles dans la configuration C2bille^{exp} en statique (contrôle normalisé à 1) et avec la séquence de stimulation 3*150 mL/min. QR signifie quantité relative, les valeurs présentées étant normalisées par rapport au contrôle lors du calcul des $\Delta\Delta CT$.

Sur l'ensemble des gènes testés, cinq sont surexprimés après l'exposition au flux. L'expression des gènes IER3, EGR1, FGF2 et IGF1 est multipliée par un facteur compris entre 3 et 5. De manière beaucoup plus nette, l'expression de PTGS2 est quant à elle multipliée par 19, ce gène est donc très sensible à l'exposition à la séquence de stimulation mécanique. Il est analysé seul par la suite pour caractériser la réponse des cellules à un stimulus mécanique. On remarque que ce gène était également le plus sensible dans les expériences en 2D du chapitre II.

3.2 Effet du nombre de séquences à flux élevé

Pour déterminer si le nombre de séquences à 150 mL/min a une influence sur la réponse cellulaire, une nouvelle expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment sur la configuration C2bille^{exp} avec la séquence 3*150 mL/min, et avec une seule séquence de 30 minutes à 150 mL/min (séquence notée 1*150 mL/min dans la suite). Les résultats de la PCR sur l'expression du gène PTGS2 avec les différentes séquences de stimulation sont présentés figure IV-5.

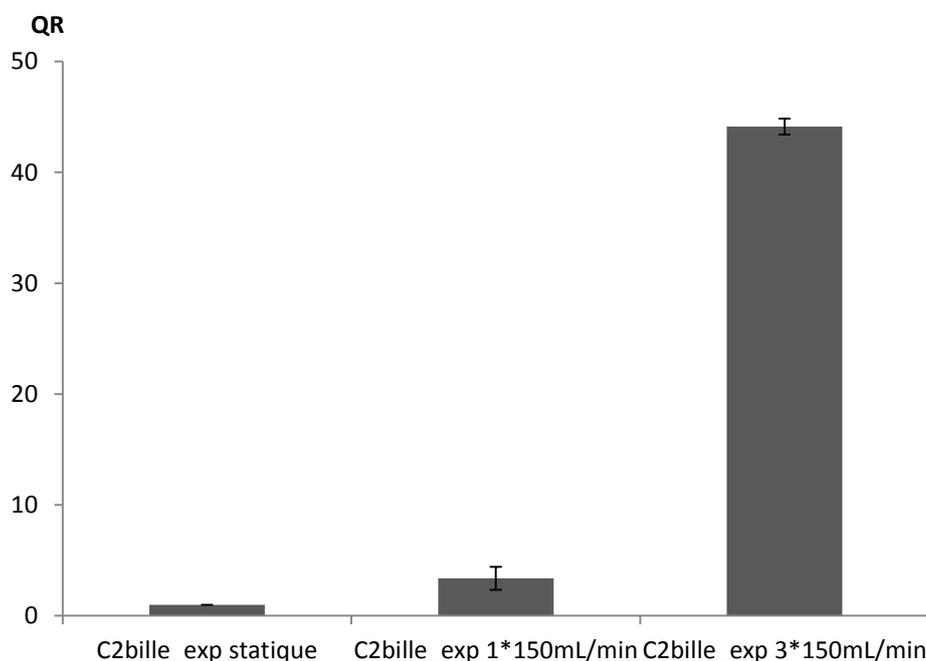


Figure IV-5 : Expression relative du gène PTGS2 dans la configuration C2bille^{exp} en statique (contrôle normalisé à 1), à 1*150 mL/min et à 3*150 mL/min. QR signifie quantité relative, les valeurs présentées étant normalisées par rapport au contrôle lors du calcul des $\Delta\Delta CT$.

L'expression du gène PTGS2 est multipliée par environ 3.4 après application d'une seule séquence de stimulation mécanique de 30 minutes à 150 mL/min. Cette augmentation d'expression est très faible par rapport à celle observée après 3 séquences de stimulation mécanique. Par la suite, la stimulation mécanique retenue pour les expériences est donc 3 séquences de stimulation à 150 mL/min espacées d'une heure à 10 mL/min.

3.3 Effet de la géométrie et du flux

Les simulations numériques avaient montré dans les résultats du chapitre III une différence nette de niveau de cisaillement entre les trois configurations Ccube, C1bille et C2bille à un flux donné. De manière à tester expérimentalement ce résultat numérique, les 3 configurations Ccube^{exp} (composée de 16 cubes), C1bille^{exp} (composée de 16 billes) et C2bille^{exp} (composée de 12 grandes billes et de 36 petites billes) ont été mises en œuvre et soumises à la séquence de stimulation 3*150 mL/min. L'expression de PTGS2 mesurée suite à cette expérience est présentée figure IV-6.

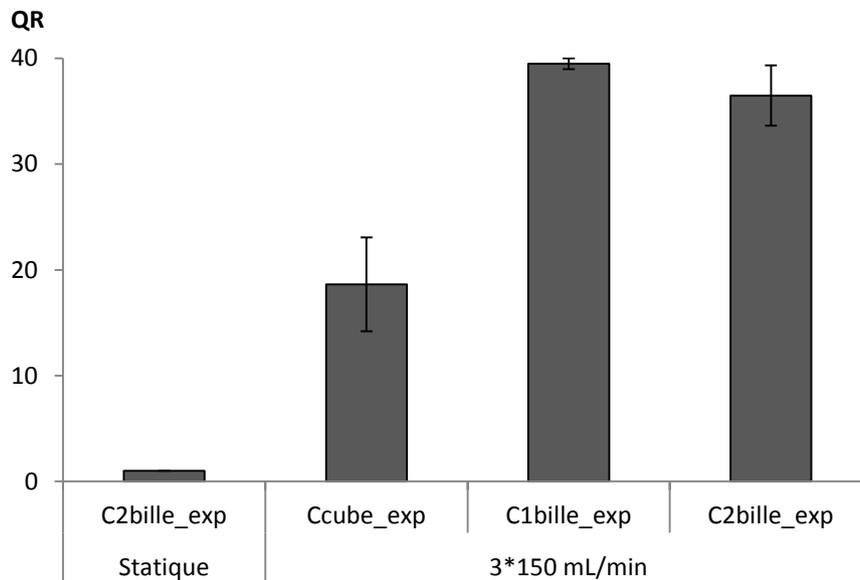


Figure IV-6 : Expression relative du gène PTGS2 dans les différentes configurations géométriques testées Ccube^{exp}, C1bille^{exp} et C2bille^{exp} dans le cas de la séquence de stimulation 3*150mL/min (contrôle C2bille^{exp} statique). QR signifie quantité relative, les valeurs présentées étant normalisées par rapport au contrôle lors du calcul des $\Delta\Delta CT$.

L'expression de PTGS2 est fortement augmentée dans toutes les configurations testées, le facteur d'augmentation est de l'ordre de 20 dans la configuration Ccube et compris entre 30 et 40 dans les configurations C1bille et C2bille. Dans ce graphe, la configuration C2bille ne présente pas d'avantage significatif par rapport à la configuration C1bille.

Les 3 configurations d'empilements ont également été soumises uniquement à un flux de 10 mL/min pendant 3h30, soit la même durée que dans l'expérience précédente. Les résultats sur

l'expression du gène PTGS2 sont présentés figure IV-7, et comparés au contrôle C2bille statique.

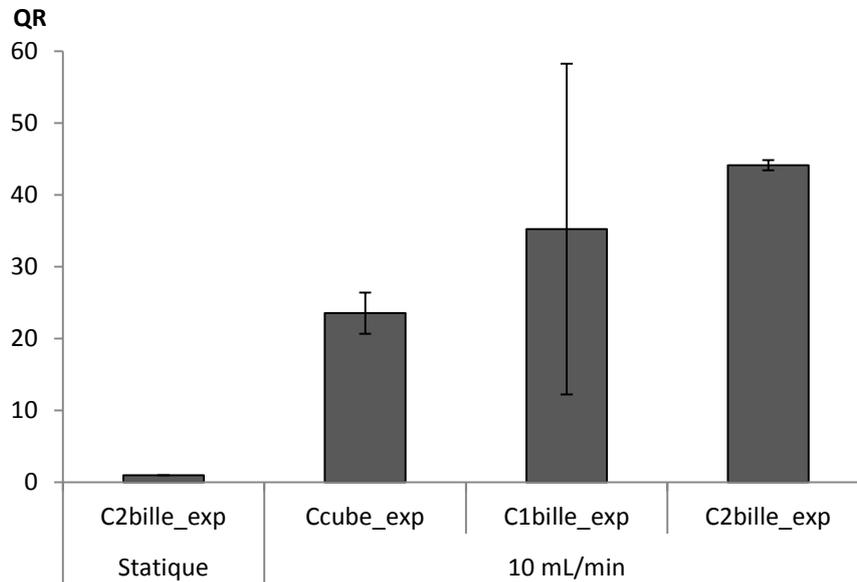


Figure IV-7 : Expression relative du gène PTGS2 dans les différentes configurations géométriques testées $Ccube^{exp}$, $C1bille^{exp}$ et $C2bille^{exp}$ dans le cas de la séquence de stimulation de 3h30 à 10mL/min (contrôle $C2bille^{exp}$ statique). QR signifie quantité relative, les valeurs présentées étant normalisées par rapport au contrôle lors du calcul des $\Delta\Delta CT$.

Il apparait que les ordres de grandeurs des résultats sont les mêmes que dans le cas de l'expérience précédente. Cependant, la configuration C2bille donne un résultat supérieur à la configuration C1bille cette fois-ci.

3.4 Comparaison des résultats expérimentaux et numériques

Dans la figure IV-8 ci-dessous sont reportés les 2 résultats précédents des expériences réalisées à 10 mL/min et à $3*150$ mL/min, ainsi que les résultats numériques de cisaillement obtenus au chapitre III. Pour chaque grandeur d'intérêt (expression relative de PTGS2 ou pente de la droite « cisaillement moyen en fonction de la vitesse moyenne d'entrée »), les barres représentent les rapports entre les configurations C1bille et Ccube d'une part, et

C2bille et Ccube d'autre part, à comparer à la configuration Ccube choisie comme contrôle et normalisée à 1.

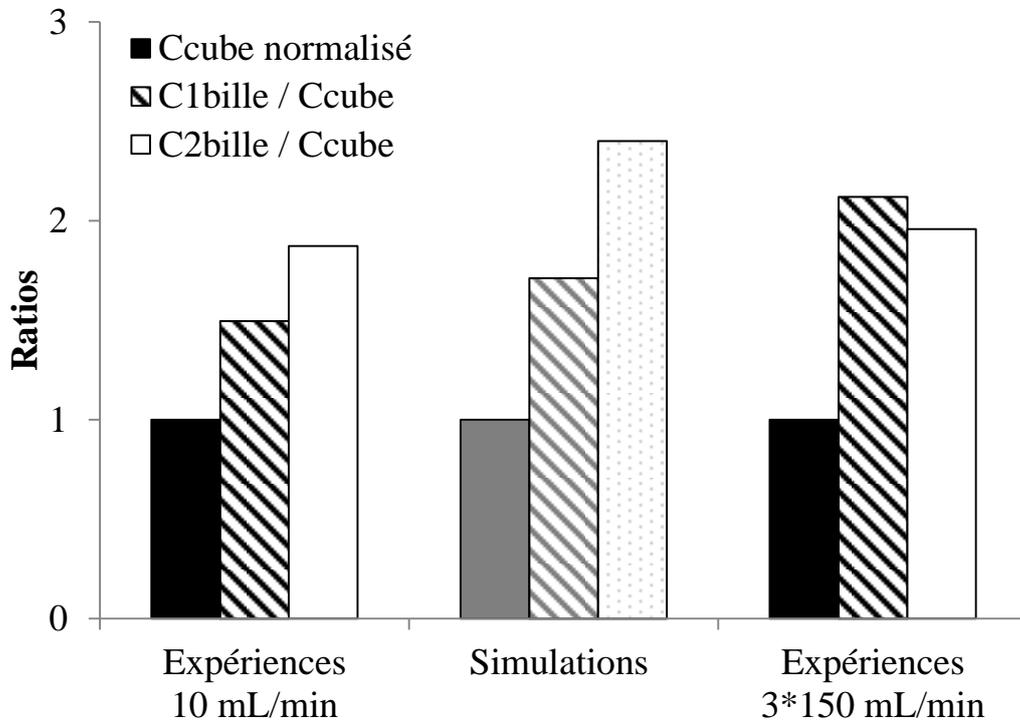


Figure IV-8 : Comparaison des résultats expérimentaux et numériques. Les résultats expérimentaux sont les rapports $C1bille^{exp}/Ccube^{exp}$ et $C2bille^{exp}/Ccube^{exp}$ de l'expression relative de PTGS2 à 10 mL/min et à 3*150 mL/min. Les résultats numériques sont les rapports $C1bille/Ccube$ et $C2bille/Ccube$ des pentes des droites « cisaillement moyen en fonction de la vitesse moyenne d'entrée ».

D'après cette figure, les rapports d'expression du gène PTGS2 à 10 mL/min sont très similaires aux rapports de cisaillements obtenus numériquement. Le même ordre de grandeur est également retrouvé entre les résultats numériques et les résultats expérimentaux à 150 mL/min sur la différence entre billes et cubes, les deux configurations $C1bille^{exp}$ et $C2bille^{exp}$ étant identiques.

4. Discussion et conclusion

Il a été constaté que pour une seule séquence de stimulation de 30 minutes à 150 mL/min, le gène PTGS2 n'a que très faiblement répondu par rapport au cas 3*150 mL/min. Cela indique que plusieurs séquences de stimulation sont nécessaires pour induire l'expression de ce gène.

Dans ce chapitre, les expériences à 10 mL/min et à 150 mL/min réalisées sur toutes les configurations de scaffold étudiées présentent une surexpression du gène PTGS2 comprise entre 20 et 40 par rapport au contrôle statique. Ainsi dans le cas d'un scaffold granulaire comme ceux étudiés ici, un flux même faible a un effet important sur la réponse cellulaire.

A 10 mL/min, une hiérarchie $C_{\text{cube}}^{\text{exp}}/C_{1\text{bille}}^{\text{exp}}/C_{2\text{bille}}^{\text{exp}}$ se dessine de la même manière que dans les résultats numériques de cisaillement. On rappelle les valeurs moyennes de cisaillement obtenues numériquement pour les différentes configurations à 10 mL/min : 0.01 Pa pour Ccube, 0.02 Pa pour C1bille et 0.04 Pa pour C2bille. A 150 mL/min, les résultats obtenus sont du même ordre de grandeur. Toutefois, la différence entre cubes et billes est plus nette et les deux configurations $C_{1\text{bille}}^{\text{exp}}$ et $C_{2\text{bille}}^{\text{exp}}$ présentent des résultats équivalents, malgré les différences de niveaux de stimulation entre ces deux configurations (0.5 Pa pour C1bille et 0.7 Pa pour C2bille à 150 mL/min). Il se pourrait qu'il existe un « effet seuil », c'est-à-dire qu'en augmentant de plus en plus le cisaillement appliqué, l'expression de PTGS2 ne dépasse jamais une certaine valeur maximale de réponse cellulaire.

L'expression du gène PTGS2 est activée avec la séquence de 3h30 à 10 mL/min et avec la séquence 3*150 mL/min mais que faiblement avec la séquence de 30 minutes à 150 mL/min. La différence de durée d'expérience peut être à l'origine des écarts observés. Un prolongement de l'expérience 1*150 mL/min par 3h supplémentaires à 10 mL/min aurait sûrement permis de confirmer cette hypothèse.

D'après les résultats du chapitre II, il existe une contrainte mécanique optimale pour stimuler les cellules souches mésenchymateuses humaines. Cette contrainte est un cisaillement de l'ordre de 0.7 Pa. D'après les résultats du chapitre III, la configuration C2bille à 150 mL/min permet d'atteindre un niveau moyen de cisaillement de 0.7 Pa, contre 0.04 Pa à 10 mL/min. L'absence de différence de réponse entre les expériences à 10 mL/min et à 3*150 mL/min était donc inattendu. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Le substrat n'est pas le même entre les expérimentations du chapitre II (polystyrène) et les expériences en bioréacteur où les cellules sontensemencées sur des particules de corail Porites. L'environnement tridimensionnel est également différent, une lame horizontale et plane d'une part et un empilement tridimensionnel de particules rugueuses d'autre part.

En conclusion, les expériences en bioréacteurs réalisées dans ce chapitre ont montré une activation du gène PTGS2 induite par le flux au sein des scaffolds granulaires. En revanche, l'absence de différence entre les expériences à 10 mL/min et à 150 mL/min conduit à penser que l'interpolation directe entre les résultats expérimentaux 2D sur lames de plastique et résultats expérimentaux 3D sur particules de corail ne peut pas être réalisée. Il semble donc intéressant de tester l'effet du substrat sur la réponse des cellules souches mésenchymateuses aux stimulations mécaniques. Ceci pourrait être réalisé en 3D, en utilisant des particules de différents biomatériaux au sein des bioréacteurs, ou bien en 2D pour mieux contrôler la contrainte mécanique appliquée, en réalisant des expériences de cisaillement sur des lames planes de différents biomatériaux. C'est cette dernière option qui sera testée dans le chapitre suivant.

Chapitre 5

Etude de l'effet du biomatériau sur la réponse des cellules au cisaillement

Résumé

Le substrat d'une cellule est un des éléments fondamentaux de son environnement tridimensionnel, notamment dans un tissu conjonctif comme le tissu osseux. Une cellule crée des liaisons avec le substrat sous forme de points focaux essentiellement composés de protéines transmembranaires appelées intégrines, qui lient le substrat aux protéines du cytosquelette. La nature du biomatériau qui compose le substrat (composition chimique, topographie de surface, rigidité, ...) a un rôle déterminant dans le métabolisme cellulaire.

Dans ce chapitre, les effets de la nature du biomatériau sur la réponse de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) à une contrainte de cisaillement ont été étudiés. Dans ce but, un dispositif de cisaillement a été spécialement conçu pour pouvoir appliquer un cisaillement donné à des cellulesensemencées sur des lames d'un biomatériau. Plusieurs matériaux et plusieurs niveaux de cisaillement ont été testés. La réponse des cellules au cisaillement est analysée en termes de phosphorylation de la protéine ERK1/2 et d'expression de gènes mécanosensibles à réponse précoce.

1. Introduction

Les études pour analyser le comportement des cellules face à des stimuli externes sont le plus souvent réalisées grâce à des expériences où les cellules sontensemencées en monocouche sur des supports de verre ou de polystyrène. De cette manière, il est facile d'observer les cellules et de leur appliquer des stimuli bien définis. Ce type d'expériences, menées dans le chapitre II, nous a indiqué un cisaillement optimal sur polystyrène d'environ 0.7 Pa. Cependant, le substrat de la cellule est le premier élément par lequel elle perçoit son environnement, elle y est attachée par des liaisons solides, qui ont une influence sur son métabolisme. Il est très probable que ce substrat ait une influence sur la réponse de la cellule à des stimuli extérieurs, notamment pour un substrat comme le corail utilisé dans les bioréacteurs du chapitre IV.

La nature des liaisons formées entre la cellule et son substrat dépend de la nature chimique du substrat lui-même. Par exemple, il a été montré que les cellules souches mésenchymateuses s'attachent et poussent plus rapidement sur le plastique de culture que sur de l'hydroxyapatite [DEL01]. Le chargement électrique local de la surface, rendant le substrat hydrophobe ou hydrophile, a également une importance significative puisque de nombreux mécanismes cellulaires sont basés sur des circulations d'ions chargés. Des études ont également montré que non seulement les cellules différencient la chimie d'un matériau mais elles sont également sensibles à la cristallinité de matériaux chimiquement identiques [BOY96].

La topographie de la surface du biomatériau influence l'adhérence, la prolifération et la différenciation cellulaire. Sur des échantillons d'hydroxyapatite, il a été montré que l'augmentation de la rugosité était positive sur la prolifération de CSM [DEL01]. Inversement, la prolifération et l'activité de l'ALP de cellules ostéoblastiques humaines ont diminué avec l'augmentation de la rugosité d'un substrat en titane [MAR95]. Ces résultats divergents suggèrent que l'influence de la topographie de surface sur les cellules dépend du

type de cellules, de l'organisation du cytosquelette, de la nature de l'adhérence cellulaire et même des interactions intercellulaires [BOY96]. De plus, l'espacement et la désorganisation d'éléments de nanotexturation jouent également un rôle sur l'adhérence cellulaire. Les informations des différences de hauteur du substrat sont transmises au noyau via les filaments d'actine et influencent l'expression génique [HUN13].

De récents travaux [YIM05, ENG06] ont également montré que la différenciation des CSM était très dépendante de la rigidité du substrat : les CSM cultivées sur un matériau au faible module élastique (équivalent à celui des tissus non minéralisés) adoptaient un phénotype de cellules neuronales, musculaires ou graisseuses. Au contraire, les CSM cultivées sur les polymères les plus durs ont plus tendance à exprimer des marqueurs osseux.

Les précédentes considérations montrent que les caractéristiques chimiques, topographiques et mécaniques du biomatériau ont une influence notable sur de nombreux aspects du comportement des CSM : morphologie de la cellule, vitesse de prolifération, activité de l'alkaline phosphatase, voie de différenciation, ... Dans ce contexte, il est raisonnable de penser que la nature du biomatériau sur lequel les cellules sontensemencées aura aussi un effet notable sur la réponse des CSM à une sollicitation de cisaillement. A ce jour et à notre connaissance, aucun travail dans la littérature n'a réalisé d'étude comparative de la réponse au cisaillement de cellules en fonction du biomatériau support.

L'objectif de cette partie est ainsi de soumettre des CSMensemencées sur différents substrats à un stimulus de cisaillement. Les différents biomatériaux testés sont : le plastique des flasques de culture (polystyrène), le corail Porites utilisé dans le bioréacteur du chapitre IV et le corail de bénitier, qui présente la même composition chimique avec une porosité quasiment nulle. La réponse des cellules est mesurée à travers l'expression de gènes mécanosensibles à réponse précoce : PTGS2, IER3 et EGR1 et la phosphorylation de la protéine ERK1/2.

2. Matériels et méthodes

2.1 Conception et développement d'un dispositif de cisaillement

Un dispositif de culture cellulaire a été développé de manière à pouvoir appliquer aux cellules en culture un cisaillement précis et contrôlé, quel que soit le type de biomatériau sur lequel elles sontensemencées. Le cahier des charges de ce dispositif est résumé ici :

- Comme tous les bioréacteurs : stérilisable, facile à assembler (pour limiter les risques de contamination), assurer une température de 37°C et une atmosphère humide avec 5% de CO₂, permettre le changement du milieu en conditions stériles, assurer un approvisionnement adéquat en substances nutritives.
- Pour cette application en particulier : transparent (pour pouvoir vérifier l'absence de bulles d'air), permettre d'appliquer un cisaillement précis et contrôlé.

Pour créer un cisaillement uniforme sur toute la surface où les cellules sontensemencées, il faut que les cellules soientensemencées au fond d'un tunnel d'épaisseur contrôlée et de largeur suffisamment grande devant l'épaisseur pour avoir un cisaillement uniforme sur la majeure partie de la largeur. Ainsi, le dispositif créé s'est inspiré des expériences de cisaillement réalisées au chapitre II.

Le cisaillement appliqué aux cellules dans un tel tunnel peut être calculé selon la formule suivante, basée sur les caractéristiques d'un écoulement d'un fluide newtonien dans une conduite à section rectangulaire [COR28] :

$$\tau(x = 0, y = -h) = \eta \frac{\Phi}{q} * \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n b \pi}{(2n + 1)^2} \left(\frac{2}{\pi}\right)^3 \tanh\left((2n + 1) \frac{\pi h}{2b}\right) \quad \text{Eq. V-1}$$

Où η est la viscosité du milieu, Φ est le flux dans le tunnel, $2h$ est la hauteur du tunnel et $2b$ sa largeur et :

$$q = \frac{4}{3}hb^3 - 8b^4 \left(\frac{2}{\pi}\right)^5 * \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^5} \tanh\left(\frac{(2n+1)\pi h}{2b}\right) \quad \text{Eq. V-2}$$

Un dispositif spécifique a donc été conçu dans le cadre de cette thèse, il est présenté figure V-1.



Figure V-1 : Dispositif de cisaillement développé. Sur la photo sont visibles la pompe, le circuit de tubulures, le flacon réservoir et le dispositif en lui-même, fermé hermétiquement grâce à un système de vis-écrous.

Le matériau choisi est le Plexiglass[®], inerte et transparent. Il est composé d'une pièce socle, dans laquelle est creusé un canal dans lequel on peut insérer une lame de biomatériauensemencé ; d'une lamelle de 0.5 mm d'épaisseur évidée en son centre de manière à créer un tunnel de 0.5 mm d'épaisseur lorsqu'elle est posée sur la lame de biomatériau ; ainsi que d'une pièce couvercle qui ferme le tunnel et est percé de 2 trous cylindriques permettant l'entrée et la sortie du milieu de culture en circulation responsable du cisaillement.

Ce dispositif est relié à une pompe péristaltique par un système de tubulure approprié. La pompe péristaltique est pilotée par le logiciel WinTest[®] 7 (Bose, USA) qui permet de définir n'importe quel régime de flux, en réglant la valeur du flux mais aussi la forme du « signal » créé ainsi que sa fréquence.

2.2 Préparation des lames et des cellules

Des lames de différents biomatériaux sont analysées. Des lames de corail sous deux formes, corail de bénitier et corail Porites, sont étudiées. Le corail Porites est le matériau qui compose les particules utilisées dans les expériences du chapitre IV. Le bénitier a été choisi pour sa composition chimique identique au Porites (carbonate de calcium) et son architecture différente, puisque c'est un matériau non poreux. Des lames de polystyrène servent de cas contrôle (découpées dans des flasques de culture). Des cellules nonensemencées sur des lames de biomatériau et restées dans les flasques de culture sont analysées. Deux conditions mécaniques sont testées, un cas statique sans flux et un cas avec un cisaillement.

Des lames de 50 mm de longueur et de 8 mm de largeur sont découpées dans les différents matériaux à tester (bénitier, Porites, polystyrène). Les lames de corail, bénitier ou Porites, sont ensuite polies successivement avec un papier P1200/4000 puis au micron sur un tapis de polissage avec pâte de diamant. Les lames de polystyrène ne sont pas polies pour ne pas dégrader le traitement de surface destiné à assurer l'adhérence cellulaire. Avant d'être ensemencées, toutes les lames sont passées dans un bain d'ultrasons pour éliminer les éventuelles impuretés, puis dans un bain de PBS-antibiotique pour les désinfecter pendant au minimum deux heures puis dans un bain de milieu de culture pendant au minimum une heure.

Parallèlement, les cellules sont préparées. Il s'agit de CSM humaines identiques à celles utilisées dans le chapitre IV, disponibles sous formes de cryotubes conservés à -80°C . Les cellules sont décongelées et mises en culture dans des flasques de culture cellulaire avec du milieu de culture α -MEM-10%SVF. Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont décollées avec de la trypsine puis réensemencées sur les lames de biomatériau. Le milieu est changé deux heures plus tard et remplacé par du milieu α -MEM-2%SVF. On laisse les

cellules adhérer une nuit avant de réaliser les expériences de cisaillement. La figure V-2 ci-dessous présente une photo de lames ensemencées dans l'incubateur.



Figure V-2 : Lames ensemencées de corail de bénitier et de polystyrène dans une boîte stérile.

2.3 Expériences de cisaillement

Le flux Φ est déterminé à partir de l'équation V-1. Avec une hauteur de fluide de 0.5 mm, le cisaillement appliqué vaut :

$$\tau \text{ (Pa)} = 0.0717 * \Phi \text{ (mL/min)} \quad \text{Eq. V-3}$$

A chaque expérience, une lame ensemencée de CSM est insérée dans le dispositif de manière stérile (sous hotte). Le circuit est ensuite disposé dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ puis branché sur la pompe péristaltique (Biodynamic[®] multicanaux, Bose, USA). Les cellules ensemencées sur la lame de biomatériau sont sollicitées en cisaillement pendant une durée de 30 minutes. La pompe fonctionne par intermittence, à une fréquence de 2.8 Hz, de manière à reproduire le mode de sollicitation appliqué au chapitre II. La figure V-3 montre le dispositif au cours d'une expérience de cisaillement sur une lame de bénitier.



Figure V-3 : Dispositif pendant une expérience de cisaillement sur une lame de corail de bécitier.

2.4 Analyses

Pour les analyses de phosphorylation de ERK1/2, à la fin de l'expérience, le dispositif est ouvert de manière stérile, la lame est rincée au PBS puis placée dans un puits où elle est rincée avec un tampon de lyse (100 μ L) de manière à dégrader les membranes cellulaires. Le lysat obtenu est immédiatement congelé à -80°C . La phosphorylation de la protéine ERK1/2 est ensuite quantifiée par une technique ELISA, et normalisée par rapport à la quantité totale de protéine dans l'échantillon, de manière à s'affranchir des inégalités de quantité de cellules d'un échantillon à l'autre. Le principe de la technique ELISA est rapidement détaillé ici : le lysat de chaque échantillon est mis dans un puits au fond duquel sont fixés des anticorps anti-ERK1/2 pour que les protéines y adhèrent. Le reste est ensuite lavé et les protéines restant au fond des puits sont remises en contact avec le même anticorps couplé à une enzyme. L'application d'un substrat compatible avec cette enzyme va émettre ensuite un signal coloré, dont la densité optique dépendra de la concentration en protéine dans le lysat initial. La figure V-4 présente une plaque d'analyse Elisa avant la dernière étape de mesure de la densité optique.

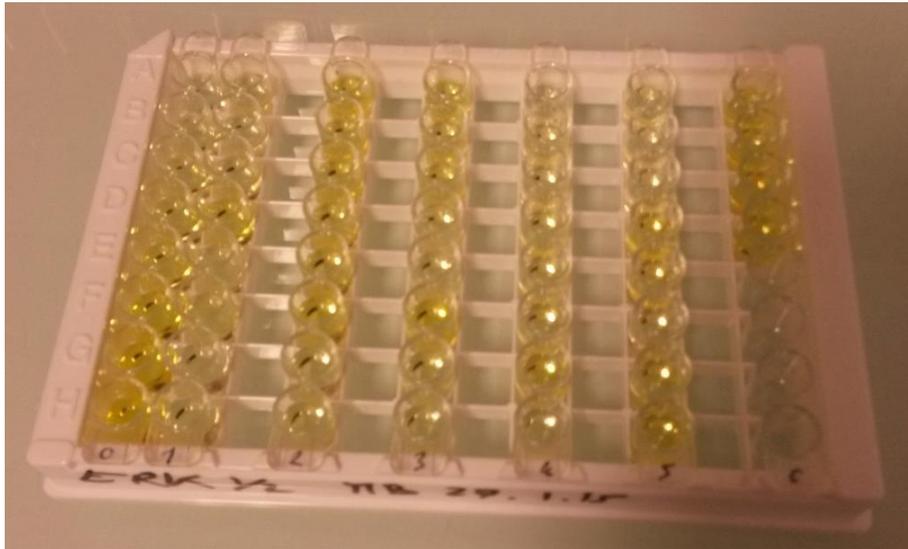


Figure V-4 : Plaque de puits pour analyse Elisa avant la dernière étape de mesure de densité optique.

Une des analyses de phosphorylation de ERK1/2 (validation du dispositif) a cependant été réalisée par Western Blot, dont le principe a déjà été expliqué.

Pour l'analyse génique, les lames sont rincées au TRIzol[®] (Invitrogen, France) et l'expression des gènes mécanosensibles à réponse précoce PTGS2, IER3 et EGR1 est analysée par une technique de RT-PCR déjà décrite précédemment.

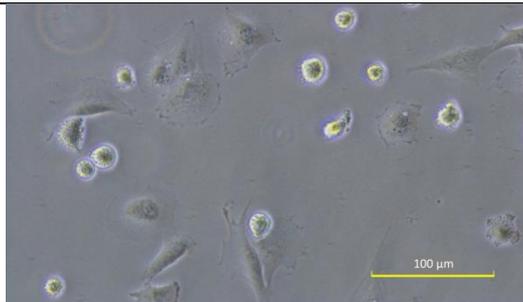
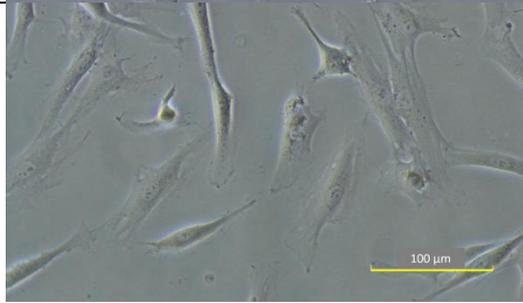
3. Résultats

3.1 Calibration de la pompe

Le débit délivré par la pompe a été vérifié, en ouvrant le circuit pompe-bioréacteur et en faisant fonctionner le programme prévu pour les expériences de cisaillement pendant 10 minutes, 3 fois.

3.2 Croissance cellulaire

Le tableau V-1 montre des photographies des cultures des CSM en flasque de culture à deux grossissements différents. Le temps entre l'ensemencement est indiqué dans la première colonne, sachant que cet ensemencement a été réalisé directement après la décongélation des cellules. Sur la première image, deux heures après l'ensemencement, on peut observer des cellules en train d'adhérer à la flasque, celles qui sont aplaties, et certaines autres qui n'ont pas encore adhéré et ont donc un aspect rond sur la photo. Après 24h, toutes les cellules vivantes adhèrent à la flasque et commencent à s'étaler. Après 48h, on peut constater que les cellules ont commencé à proliférer. La croissance continue à 72h et à 7 jours, les cellules devenant de plus en plus fusiformes au fur et à mesure que leur densité augmente. Au bout de 7 jours, la flasque de culture est quasiment à confluence, c'est-à-dire que l'intégralité de sa surface est recouverte de cellules. Les cellules sont alors prêtes à être décollées, soit pour être réensemencées dans plusieurs flasques pour continuer la phase de prolifération, soit pour être réensemencées sur les lames pour l'expérience de cisaillement.

Temps de culture	Grossissement x20 (échelle=100 µm)	Grossissement x10 (échelle=200 µm)
2h		
24h		

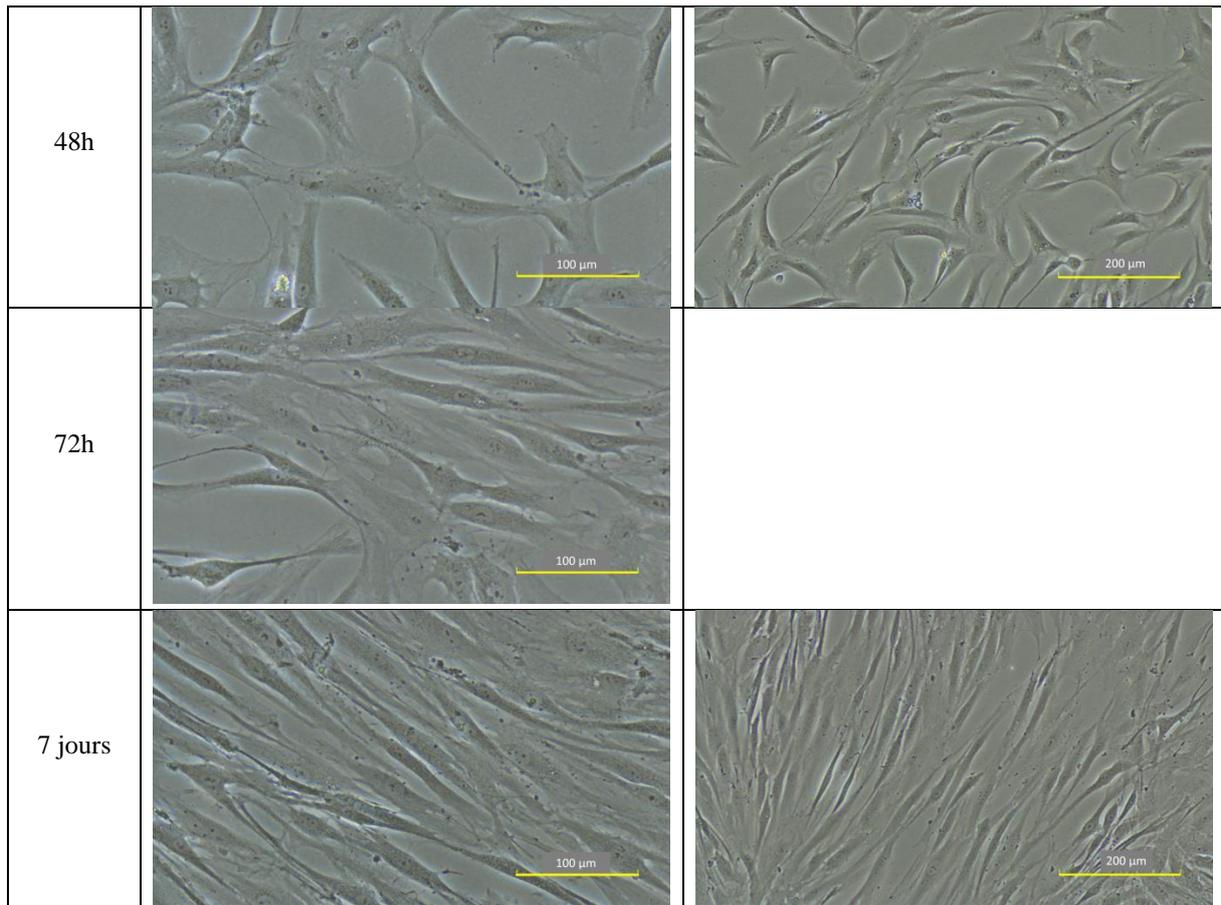


Tableau V-1 : Photographies au microscope optique des CSM humaines en culture au fur et à mesure de leur croissance en flasque de culture.

3.3 Ensemencement des lames de biomatériau

Après l'ensemencement sur les lames de corail, il devient impossible d'observer les cellules au microscope optique en transmission. Une lame témoin (bénitier) a donc été ensemencée en plus des lames prévues pour les expériences de cisaillement pour vérifier la présence et la densité des cellules. Cette lame a été analysée au microscope confocal multiphotonique (Nikon A1R MP PLUS®). La figure V-5 ci-dessous montre une image typique obtenue sur une zone de 500 μm par 500 μm. Certains filaments du cytosquelette apparaissent fluorescents, ce qui permet de distinguer les cellules, leur nombre et leur forme. Le noyau des cellules apparaît lui en noir. Cette image a permis de vérifier qu'il y avait une bonne densité cellulaire sur les lames de corail.

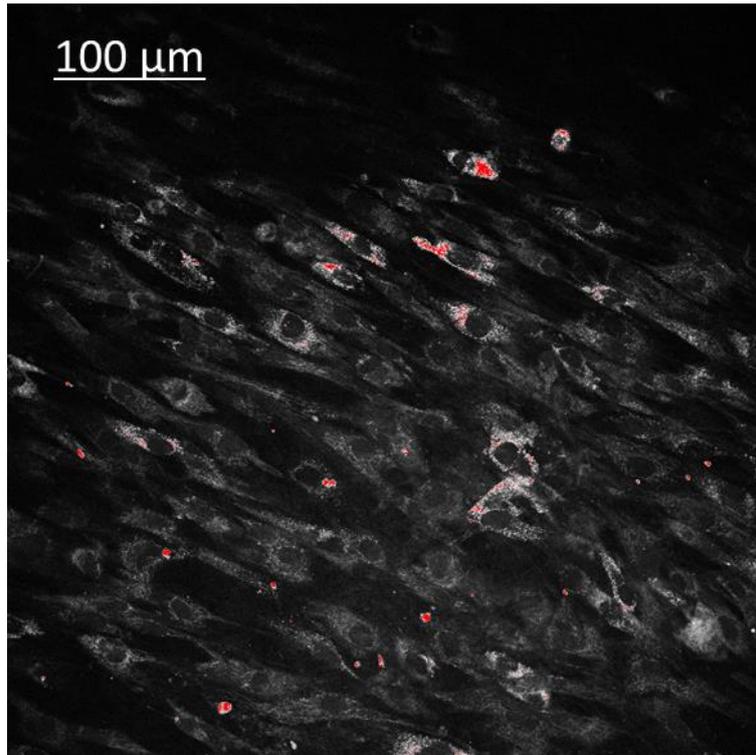


Figure V-5 : Image obtenue en microscopie confocale multiphotonique lors de l'observation d'une lame de corail de bénitierensemencée avec des CSM humaines.

3.4 Résultats des analyses de la phosphorylation de ERK1/2

3.4.1 Validation du dispositif de cisaillement sur lames de polystyrène

Le dispositif de cisaillement développé au cours de ce travail est testé une première fois pour vérifier sa capacité à fournir aux cellules une contrainte de cisaillement maîtrisée. Ainsi plusieurs lames de polystyrène sont préparées etensemencées et plusieurs niveaux de cisaillement sont appliqués compris entre 0.17 Pa et 1.96 Pa, chaque niveau de cisaillement étant appliqué à une seule lame. Le cas contrôle est une lame de polystyrène à laquelle aucun cisaillement n'est appliqué. Les résultats de ce test sont présentés figure V-6, qui donne la phosphorylation de ERK1/2 mesurée par Western Blot en fonction du cisaillement appliqué aux CSM pendant 30 minutes.

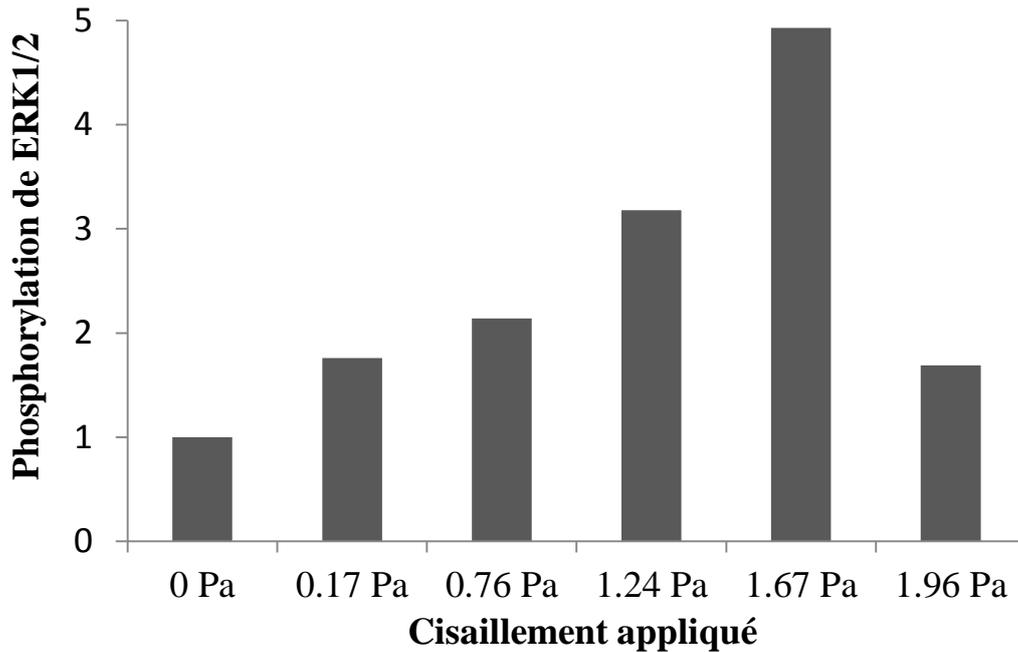


Figure V-6 : Induction de la phosphorylation de ERK1/2 au sein des cellulesensemencées sur lames de polystyrène en fonction du cisaillement appliqué pendant 30 minutes.

Tous les niveaux de phosphorylation pour tous les cisaillements testés sont supérieurs au niveau basal du contrôle. La phosphorylation augmente régulièrement de 0 à 1.67 Pa pour atteindre un facteur de 5 par rapport au niveau basal. Le cisaillement à 1.96 Pa en revanche montre une décroissance nette par rapport au cisaillement de 1.67 Pa et le niveau de phosphorylation est le plus bas de tous les cisaillements testés. Ces résultats confirment que la phosphorylation de ERK1/2 constitue un bon marqueur pour quantifier la réponse des cellules souches au cisaillement. Ils corroborent également les résultats du chapitre II.

3.4.2 Phosphorylation de ERK1/2 sur les autres biomatériaux

La phosphorylation de ERK1/2 est ensuite mesurée sur les cellules qui ont étéensemencées sur le corail de bénitier et Porites et stimulées pendant 30 minutes à 0.90 Pa. Le cas contrôle est une flasque de culture dans laquelle aucun cisaillement n'est appliqué. Chaque expérience est réalisée sous forme de tripliquas. Les résultats de cette expérience sont présentés figure V-7.

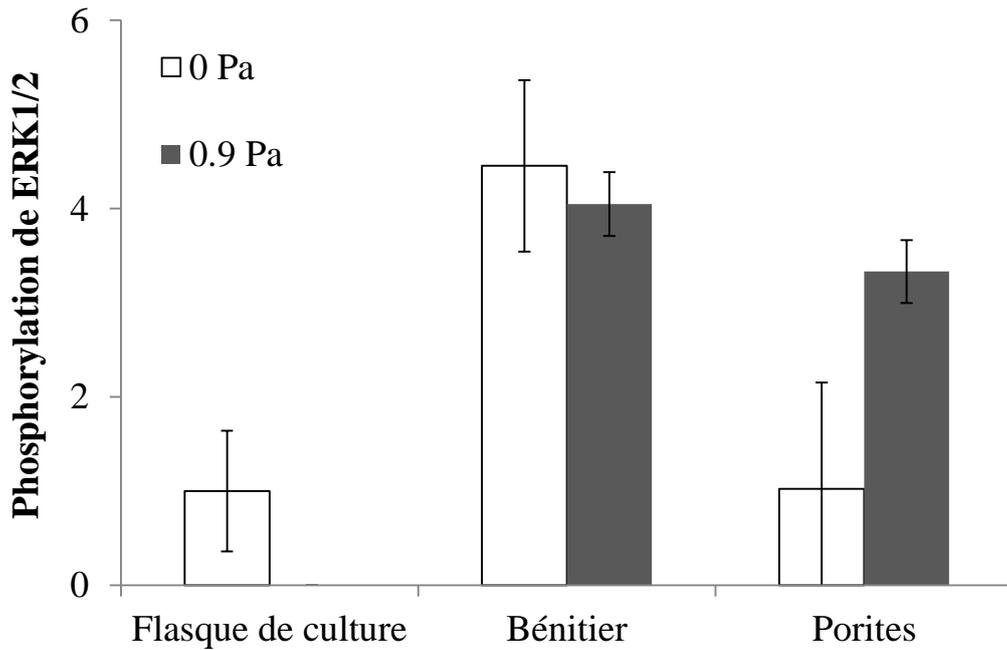


Figure V-7 : Induction de la phosphorylation de ERK1/2 au sein des cellules ensemencées en flasques et sur lames de corail en fonction du cisaillement appliqué pendant 30 minutes.

A 0 Pa, il apparaît que la phosphorylation de ERK1/2 a été induite dans le cas de l'ensemencement sur les lames de bénitier, mais ceci n'est pas observé dans le cas du corail Porites. En ce qui concerne l'application du cisaillement à 0.9 Pa, la phosphorylation de ERK1/2 est induite par l'application de la contrainte sur le Porites mais pas sur le corail de bénitier. On note cependant une importante variabilité à 0 Pa pour le corail Porites.

3.4.3 Analyse de l'expression génique en fonction du cisaillement et du biomatériau

L'analyse de ERK1/2 ne pouvant être utilisée dans le cas du bénitier en raison de l'induction de sa phosphorylation par le matériau, une analyse génique a été effectuée. L'expression relative des gènes PTGS2, IER3 et EGR1 a été analysée sur les lames de polystyrène et de corail de bénitier. Les résultats sont présentés figures V-8 et V-9. Dans les deux cas, il est observé un très léger effet du cisaillement.

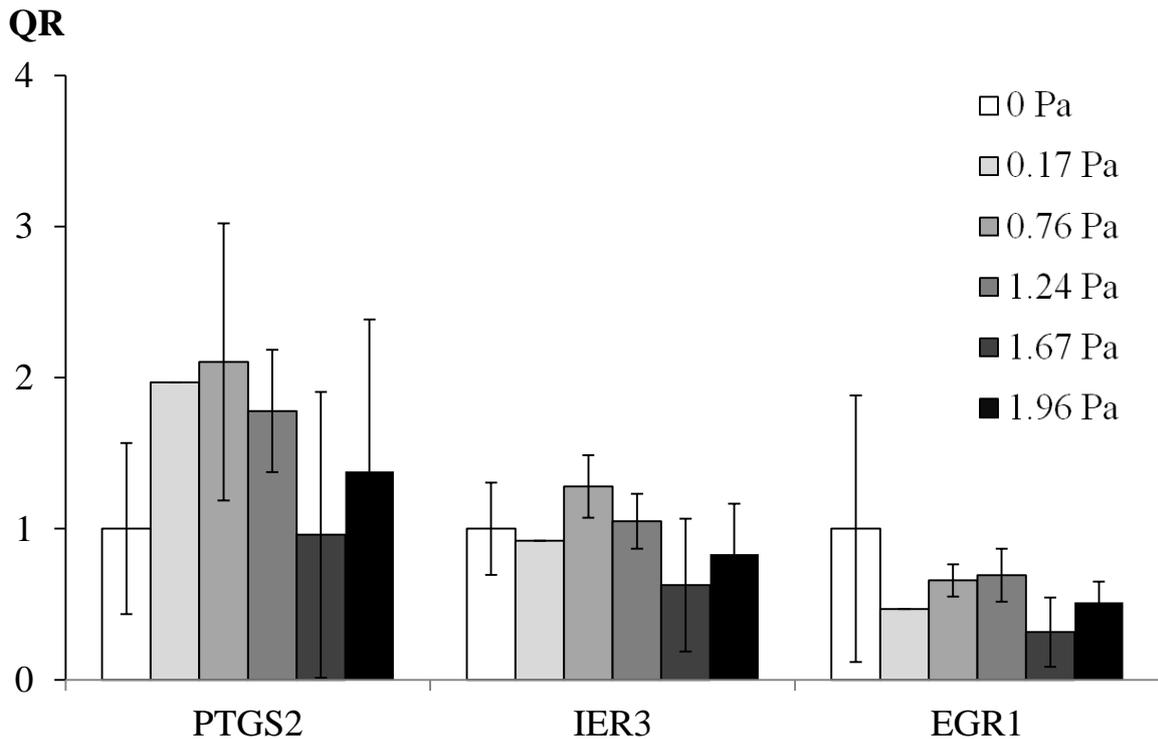


Figure V-8 : Expression génique mesurée par RT-PCR par des CSMensemencées sur lame de corail de bénitier, en fonction du cisaillement appliqué. QR signifie quantité relative, les valeurs présentées étant normalisées par rapport au contrôle lors du calcul des $\Delta\Delta CT$.

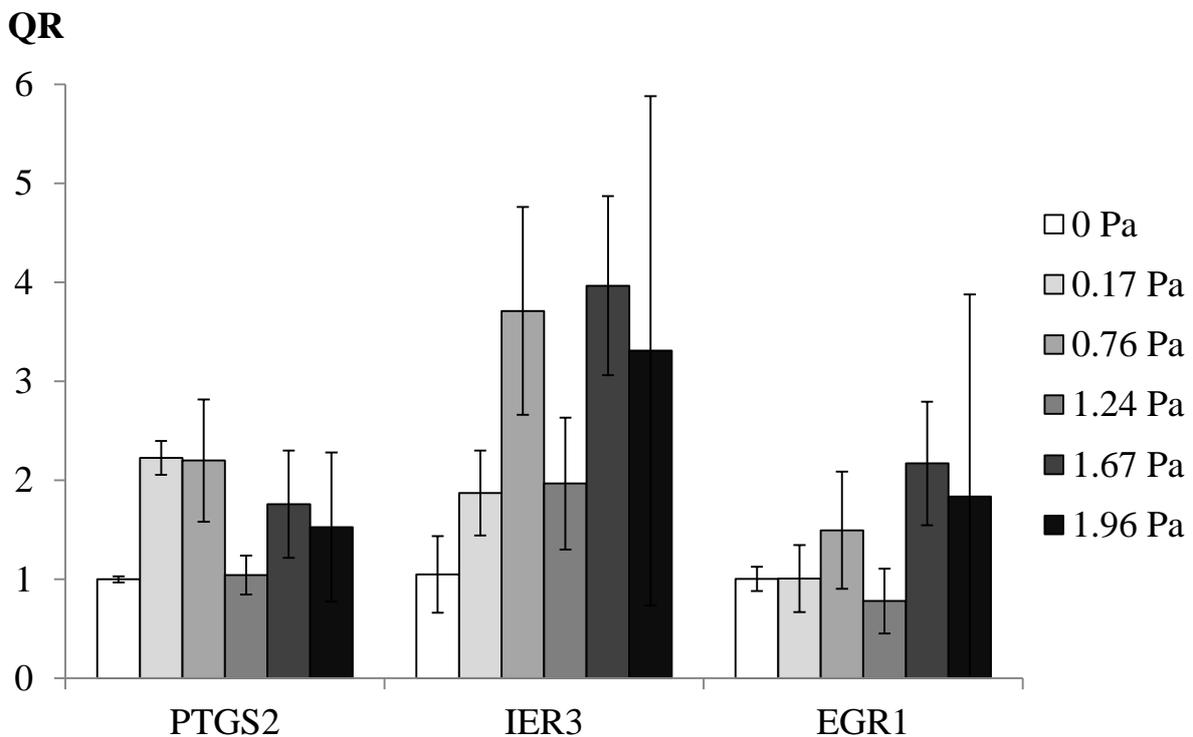


Figure V-9 : Expression génique mesurée par RT-PCR par des CSMensemencées sur lame de polystyrène, en fonction du cisaillement appliqué. QR signifie quantité relative, les valeurs présentées étant normalisées par rapport au contrôle lors du calcul des $\Delta\Delta CT$.

4. Discussion et conclusion

Un dispositif a été conçu dans l'optique d'appliquer un cisaillement bien défini à des cellules ensemencées sur différents biomatériaux. Ce dispositif a été validé. Des lames de différents biomatériaux ont pu être insérées dans le dispositif. Une fois calibré précisément en termes de dimensions et de flux, la contrainte mécanique exacte appliquée aux cellules peut être mesurée et contrôlée. Les CSM, sensibles aux contraintes de cisaillement, répondent notamment par l'activation de la protéine ERK1/2 et ceci a pu être observé pour les cellules ensemencées sur lames de polystyrène pour différents niveaux de cisaillement.

Ce résultat montre également qu'il existe probablement un cisaillement optimal pour activer ERK1/2. Ce cisaillement optimal est aux alentours de 1.67 Pa dans le cas de cellules souches ensemencées sur les lames de polystyrène, ou du moins compris entre 1.24 Pa et 1.96 Pa. Ce cisaillement optimal dépend du biomatériau sur lequel les cellules adhèrent. En effet les résultats sur l'expression génique montrent que les mêmes niveaux de cisaillement ne donnent pas les mêmes résultats d'un biomatériau à l'autre. Il est également envisageable que le cisaillement qui est le plus influent sur la phosphorylation de ERK1/2 ne soit pas celui qui est le plus influent sur l'activation des gènes ou la production de monoxyde d'azote NO. On peut cependant remarquer que les résultats de phosphorylation de ERK1/2 (figure V-6) ont la même allure croissante puis décroissante que les résultats de production de NO avec les mêmes cellules et sur un support équivalent (figure II-3a, chapitre II). Ils permettent même d'affiner ces résultats puisque 5 points de cisaillement ont été réalisés entre 0.1 Pa et 2.1 Pa, contre un seul point à 0.7 Pa dans ces expériences du chapitre II.

L'étude de la phosphorylation de ERK1/2 sur les lames de corail apporte plusieurs enseignements. Dans le cas du bénitier, le simple fait de transférer les cellules de la flasque de culture aux lames de corail active la phosphorylation de ERK1/2 même sans application de

cisaillement. Ceci peut être dû à la nature physicochimique du biomatériau et/ou des liaisons qui se créent entre le biomatériau et les cellules. Par conséquent, l'application d'un cisaillement à ces cellules n'augmente pas le niveau de phosphorylation de ERK1/2 par rapport au cas statique. Ainsi il apparaît qu'il existe un plafond de phosphorylation et que celle-ci ne peut pas augmenter à l'application d'un flux si elle est déjà activée en statique par le fait de l'adhérence des cellules au biomatériau. En revanche, dans le cas du corail de Porites, la protéine ERK1/2 n'est pas activée dans le cas statique et on peut observer une différence entre le niveau basal de phosphorylation à 0 Pa et le niveau obtenu après application du cisaillement pendant 30 minutes. Le cisaillement a donc bien un effet sur la phosphorylation de la protéine ERK1/2, mais seulement dans le cas où celle-ci n'est pas déjà « pré-activée » sur le biomatériau. La différence de phosphorylation entre les deux matériaux à 0 Pa ne peut pas s'expliquer par une différence de chimie du biomatériau. On peut en déduire une importance fondamentale de l'état de surface, de la rugosité et de la porosité du matériau.

Enfin, il est à noter que toutes les expériences de ce chapitre présentent des résultats globalement plus faibles que ceux attendus. Lorsqu'un effet du cisaillement est observé, les niveaux d'activation des gènes et de la protéine ERK1/2 sont assez faibles. Certaines expériences n'ont pas donné de résultats concluants en raison de ces faibles niveaux de réponse. Le système développé et le plan d'expérience dans son ensemble présentent des limites. Le dispositif créé présente des imperfections, les dimensions des différents éléments présentent nécessairement des imprécisions, de même pour les lames. En effet, celles-ci ont dû être découpées puis polies, en pratique elles avaient toutes des dimensions différentes et certaines par exemple ne faisaient pas exactement la même épaisseur tout le long de la lame. De plus, la densité cellulaire des lames avant les expériences de cisaillement n'a pas pu être contrôlée sur les lames de corail. Sur le corail de Porites, poreux, une partie des cellules s'est

probablementensemencées au fond des pores en contact avec la surface supérieure et n'ont donc pas pu être en contact avec le flux à l'origine du cisaillement. Enfin, la lamelle évidée disposée sur la lame de biomatériau crée un canal de 5 mm de largeur et repose sur la lame de part et d'autre, créant ainsi des zones où les cellules ne sont pas stimulées.

Cependant, en ayant désormais conscience des aléas expérimentaux, le dispositif créé est fonctionnel et pourra être réutilisé pour répondre à de nouvelles questions sur la réponse de cellules au cisaillement en fonction de leur substrat.

Conclusion et perspectives

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au phénomène de mécanotransduction à travers la sensibilité des cellules souches mésenchymateuses aux contraintes mécaniques. Dans un contexte d'ingénierie tissulaire osseuse, ces cellules sont cultivées dans des bioréacteurs qui leur fournissent, entre autres, un environnement mécanique tridimensionnel. Les objectifs de ce travail étaient de comprendre à quelles contraintes mécaniques les cellules souches mésenchymateuses sont les plus sensibles et de proposer des pistes d'amélioration des bioréacteurs existants en tirant partie de cette sensibilité. Pour cela, des expériences ont été réalisées sur des cultures de cellules souches mésenchymateuses, en 2D et en 3D, et de nombreux marqueurs biologiques de la réponse cellulaire aux stimuli mécaniques ont été analysés. Des simulations numériques du flux au sein d'un bioréacteur d'ingénierie tissulaire osseuse ont également été réalisées pour comprendre les niveaux et distributions de contraintes mécaniques appliquées aux cellules.

Le premier chapitre bibliographique s'attache dans un premier temps à une description du tissu osseux, connaissance indispensable au développement de dispositifs permettant de reproduire du tissu osseux *in vitro*. Le phénomène de mécanotransduction est ensuite abordé et un état des connaissances de la sensibilité des cellules souches mésenchymateuses humaines aux contraintes mécaniques est dressé. Puis le principe de l'ingénierie tissulaire et les premiers résultats fondamentaux dans le cas du tissu osseux sont décrits. Les bioréacteurs à perfusion et leurs paramètres sont ensuite étudiés du point de vue de la réponse des cellules aux contraintes mécaniques. Enfin, l'accent est mis sur le développement des outils numériques pour aider à la compréhension des phénomènes mécaniques au sein des

bioréacteurs et à leur optimisation. L'ensemble de ce chapitre permet de rappeler l'importance fondamentale de la prise en compte de la sensibilité des cellules aux contraintes mécaniques dans la conception des bioréacteurs, et un travail de recherche est encore nécessaire sur des aspects à la fois biologiques et mécaniques, pour améliorer nos connaissances sur l'effet des contraintes mécaniques sur la fonction cellulaire et pour optimiser les bioréacteurs du point de vue de la mécanotransduction.

Dans le chapitre II, des expériences ont été mises en œuvre pour déterminer à quel type de contrainte mécanique les cellules souches mésenchymateuses humaines sont les plus sensibles. Des cellules ont été soumises soit à une contrainte de cisaillement, soit à une contrainte de compression hydrostatique, de différents niveaux. La production de monoxyde d'azote, l'expression de gènes caractéristiques de la mécanotransduction et la phosphorylation de ERK1/2 ont été analysées. Les résultats obtenus montrent que les cellules souches mésenchymateuses humaines sont particulièrement sensibles à une contrainte mécanique de cisaillement, de l'ordre du Pascal.

Dans le chapitre III, une simulation numérique de dynamique des fluides est réalisée dans le but de modéliser le flux au sein d'un bioréacteur en colonne et à travers différents types de scaffolds granulaires. Les scaffolds sont créés numériquement à partir du logiciel LMGC90 puis les simulations d'écoulement sont réalisées avec le logiciel Comsol Multiphysics. Les niveaux et les distributions de cisaillement aux parois des particules sont analysés en fonction du flux d'entrée et de la configuration géométrique du scaffold. Ce chapitre permet d'établir que les scaffolds granulaires sont aussi efficaces pour convertir le flux en contraintes de cisaillement appliquées aux cellules que les scaffolds massifs poreux décrits dans la littérature. De plus, la configuration bidisperse de billes apparaît comme étant la meilleure parmi celles testées par rapport au niveau mais aussi à l'homogénéité des contraintes au sein de l'empilement.

Le chapitre IV consistait en la mise en œuvre expérimentale des configurations numériques du chapitre III. Ainsi des cellules souches mésenchymateuses ont étéensemencées sur plusieurs configurations de scaffolds granulaires, composés de particules de corail, et soumises à différents niveaux de flux. L'expression génique de ces cellules a été analysée et a montré que le flux induisait une surexpression du gène PTGS2 mais du même ordre de grandeur pour 10 ml/min et pour 150 mL/min, alors que les niveaux de stimulations (évalués au chapitre III) sont différents et que les cellules répondent de manière très différente à ces stimuli lors des cultures 2D sur polystyrène (chapitre II).

Le substrat des cellules jouant très probablement un rôle important dans la réponse cellulaire aux contraintes mécaniques, des études expérimentales de cisaillement sur des cellules souches mésenchymateuses humainesensemencées sur différents types de biomatériaux (polystyrène et corail) ont été réalisées dans le chapitre V. L'expression de certains gènes ainsi que la phosphorylation de ERK1/2 ont été analysées. Ces expériences ont montré que l'effet du cisaillement sur l'activité des cellules était dépendant du substrat sur lequel se trouvaient les cellules. Par exemple, un corail de bénitier active la phosphorylation de ERK1/2 au repos contrairement à un corail de type Porites.

En conclusion cette étude multidisciplinaire a permis de montrer que les cellules souches mésenchymateuses humaines sont sensibles aux contraintes mécaniques, en particulier de cisaillement, mais leur réponse dépend largement du substrat sur lequel elles sontensemencées. L'analyse numérique des contraintes mécaniques menée dans le chapitre III a permis de mieux connaître l'environnement des cellules au sein d'un bioréacteur à scaffolds granulaires, comme celui mis en œuvre dans le chapitre IV. La non-corrélation entre les résultats du chapitre II et ceux du chapitre IV indique que la nature du biomatériau et sa forme géométrique tridimensionnelle ont un effet important sur la fonction cellulaire, et ceci a été partiellement testé et confirmé dans le chapitre V.

Les réponses obtenues dans ce travail soulèvent de nouvelles questions et sont une base pour de nouveaux axes de réflexion, à la fois du point de vue numérique et du point de vue expérimental. Par la suite, trois perspectives de ce travail devraient être abordées.

Cette thèse montre que les résultats obtenus avec une culture en 2D sur polystyrène ne sont pas directement transposables à un bioréacteur 3D avec particules de corail. Les premières études biomatériaux en 2D réalisées au cours de ce travail doivent être perfectionnées et multipliées en prenant en compte la topographie de surface. Cependant, on ne peut négliger l'environnement tridimensionnel qui a également un rôle déterminant sur le niveau, la distribution et l'homogénéité des contraintes mécaniques d'une part, et sur la fonction cellulaire d'autre part. L'ensemble des paramètres tridimensionnels des scaffolds granulaires (taille des particules, dispersion de la taille des particules, courbure des particules) pourraient être étudiés expérimentalement en utilisant des granules modèles. Dans un premier temps, nous envisageons de réaliser des cultures 3D en bioréacteurs sur des scaffolds de corail et de verre.

Le microenvironnement des cellules dans un bioréacteur est composé du biomatériau et de la mécanostimulation induite par le flux, mais aussi du milieu de culture en lui-même. Celui utilisé dans ce travail est un milieu de culture « classique » pour la culture des CSM. Le milieu pourrait être supplémenté avec des molécules biochimiques « signaux » pour stimuler l'activité des CSM et favoriser leur différenciation en ostéoblastes, comme par exemple des substances produites par les ostéocytes ou les ostéoclastes, de manière à mimer les processus biologiques existants *in vivo* lors des phases de mécanosensation-résorption-apposition.

Enfin, les résultats numériques et expérimentaux obtenus dans ce travail de thèse sur les cultures en bioréacteurs ont permis de tirer des conclusions sur les conditions à réunir pour garantir une mécanostimulation homogène et efficace des cellules souches humaines. Ces

résultats seront utilisés pour réaliser des cultures de cellules souches mésenchymateuses de brebis sur particules de corail pendant une semaine. Les particulesensemencées seront ensuite implantées dans des brebis au niveau d'un défaut métatarsien. Les résultats de réparation et d'ostéoformation pourront être comparés à ceux obtenus préalablement avec des cellules non stimulées mécaniquement.

Références bibliographiques

[AJU99] Ajubi, N.E., Klein-Nulend, J., Alblas, M.J., Burger, E.H., Nijweide, P.J. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE(2) production by cultured osteocytes. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism* 276, E171, 1999.

[ALL07] Allison, R.F., Sargent, C.Y., Dulaney, K.O., Bernacki, S.H., Lobo, E.G. Differential effects on messenger ribonucleic acid expression by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells seeded in agarose constructs due to ramped and steady applications of cyclic hydrostatic pressure. *Tissue Engineering* 13, 1151, 2007.

[ALV07] Alvarez-Barreto, J.F., Linehan, S.M., Shambaugh, R.L., Sikavitsas, V.I. *Annals of biomedical engineering* 35, 429, 2007.

[ARD01] Ardizzoni, A. Osteocyte lacunar size-lamellar thickness relationships in human secondary osteons. *Bone* 28, 215, 2001.

[ARL11] Arlt, A., Schäfer, H. Role of immediate early response 3 (IER3) gene in cellular stress response, inflammation and tumorigenesis. *European Journal of Cell Biology* 90, 545, 2011.

[BAK01] Bakker, A.D., Soejima, K., Klein-Nulend, J., Burger, E.H. The production of nitric oxide and prostaglandin E2 by primary bone cells is shear stress dependent. *Journal of biomechanics* 34, 671, 2001.

[BAK03] Bakker, A.D., Joldersma, M., Klein-Nulend, J., Burger, E.H. Interactive effects of PTH and mechanical stress on nitric oxide and PGE(2) production by primary mouse osteoblastic cells. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism* 285, E608, 2003.

[BAN02] Bancroft, G.N., Sikavitsas, V.I., van den Dolder, J., Sheffield, T.L., Ambrose, C.G., Jansen, J.A., Mikos, A.G. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12600, 2002.

[BAN11] Ban, Y., Wu, Y., Yu, T., Geng, N., Wang, Y., Liu, X., Gong, P. Response of osteoblasts to low fluid shear stress is time dependent. *Tissue & Cell* 43, 311, 2011.

[BAS10] Bassaneze, V., Barauna, V.G., Lavini-Ramos, C., Kalil, J., Schettert, I.T., Miyakawa, A.A., Krieger J.E. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 19, 371, 2010.

[BAS94] Bassey, E.J., Ramsdale, S.J. Increase in femoral bone-density in young-women following high-impact exercise. *Osteoporosis international* 4, 72, 1994.

- [BIK11] Bikle, D.D., Wang, Y. Insulin-like growth factor-I and bone. *IBMS Bonekey* 8, 328, 2011.
- [BON06] Bonewald, L.F. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey osteovision* 3, 7, 2006.
- [BOS06] Boschetti, F., Raimondi, M.T., Migliavacca, F., Dubini, G. Prediction of the micro-fluid dynamic environment imposed to three-dimensional engineered cell systems in bioreactors. *J Biomech* 39, 418, 2006.
- [BOU15] Bouët, G., Marchat, D., Cruel, M., Malaval, L., Vico, L. In vitro three-dimensional bone tissue models : from cells to controlled and dynamic environment. *Tissue Engineering part B* **21**, 133, 2015.
- [BOY96] Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D., Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17, 137, 1996.
- [BOY99] Boyde, A., Corsi, A., Quarto, R., Cancedda, R., Bianco, P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants : evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* 24, 579, 1999.
- [BUR99] Burger, E.H., Klein-Nulend, J. Mechanotransduction in bone – role of the lacunocanalicular network. *The FASEB journal* 13, S101, 1999.
- [CAP91] Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research* 9, 641, 1991.
- [CAP94] Caplan, A.I. The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery* 21, 429, 1994.
- [CAR03] Cartmell, S.H., Porter, B.D., Garcia, A.J., Guldberg, R.E. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro. *Tissue Engineering* 9, 1197, 2003.
- [CAR13] Carbonell, W.S., DeLay, M., Jahangiri, A., Park, C.C., Aghi, M.K. B1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Research* 73, 3145, 2013.
- [CIO06] Cioffi, M., Boschetti, F., Raimondi, M.T., Dubini, G. Modeling evaluation of the fluid-dynamic microenvironment in tissue-engineered constructs: A micro-CT based model. *Biotechnol Bioeng* 93, 500, 2006.
- [CIO08] Cioffi, M., Küffer, J., Ströbel, S., Dubini, G., Martin, I., Wendt, D. Computational evaluation of oxygen and shear stress distributions in 3D perfusion culture systems: Macro-scale and micro-structured models. *J Biomech* 41, 2918, 2008.

- [COR13] Correia, C., Bhumiratana, S., Sousa, R.A., Reis, R.L., Vunjak-Novakovic, G. Sequential application of steady and pulsatile medium perfusion enhanced the formation of engineered bone. *Tissue Engineering part A* 19, 1244, 2013.
- [COR28] Cornish, R.J. Flow in a Pipe of Rectangular Cross-Section. *Proc. R. Soc. A* 120, 691, 1928.
- [CRU15] Cruel, M., Bensidhoum, M., Nougulier-Lehon, C., Dessombz, O., Becquart, P., Petite, H., Hoc, T. Numerical study of granular scaffold efficiency to convert fluid flow into mechanical stimulation in bone tissue engineering. *Tissue Engineering part C*, 2015.
- [CUK01] Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., Yamada, K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294, 1708, 2001.
- [DAT05] Datta, N., Holtorf, H.L., Sikavitsas, S.I., Jansen, J.A., Mikos, A.G. Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *Biomaterials* 26, 971, 2005.
- [DAT06] Datta, N., Pham, Q.P., Sharma, U., Sikavitsas, V.I., Jansen, J.A., Mikos, A.G. In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2488, 2006.
- [DAV11] David, B., Bonnefont-Rousselot, D., Oudina, K., Degat, M.C., Deschepper, M., Viateau, V., Bensidhoum, M., Oddou, C., Petite, H. A perfusion bioreactor for engineering bone constructs: an in vitro and in vivo study. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 505, 2011.
- [DEL01] Deligianni, D.D., Katsala, N.D., Koutsoukos, P.G., Missirlis, Y.F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 22, 87, 2001.
- [DON03] Donahue, T.L.H., Haut, T.R., Yellowley, C.E., Donahue, H.J., Jacobs, C.R. Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport. *J of Biomech* 36, 1363, 2003.
- [DON09] Dong, J.D., Gu, Y.Q., Li, C.M., Wang, C.R., Feng, Z.G., Qiu, R.X., Chen, B., Li, J.X., Zhang, S.W., Wang, Z.G., Zhang, J. Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts. *Acta Pharmacologica Sinica* 30, 530, 2009.
- [DUN95] Duncan, R.L., Turner, C.H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcified tissue international* 57, 344, 1995.
- [ENG06] Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677, 2006.

- [FAN06] Fan, X., Rahnert, J.A., Murphy, T.C., Nanes, M.S., Greenfield, E.M., Rubin, J. Response to mechanical strain in an immortalized pre-osteoblast cell is dependent on ERK1/2. *Journal of cellular physiology* 207, 454, 2006.
- [GAR14] Gardel, L.S., Serra, L., Reis, R.L., Gomes, M.E. Use of perfusion bioreactors and large animal models for long bone tissue engineering. *Tissue Engineering part B* 20, 126, 2014.
- [GAS12] Gaspar, D.A., Gomide, V., Monteiro, F.J. The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter* 2, 1, 2012.
- [GLO98] Glowacki, J., Mizuno, S., Greenberger, J.S. Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture. *Cell transplantation* 7, 319, 1998.
- [GOL01] Goldstein, A.S., Juarez, T.M., Helmke, C.D., Gustin, M.C., Mikos, A.G. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 22, 1279, 2001.
- [GOM03] Gomes, M.E., Sikavitsas, V.I., Behraves, E., Reis, R.L., Mikos, A.G. Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 67A, 87, 2003.
- [GRA08] Grayson, W.L., Bhumiratana, S., Cannizzaro, C., Grace Chao P.H., Lennon, D.P., Caplan, A.I., Vunjak-Novakovic G. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Engineering : part A* 14, 1809, 2008.
- [GRE09] Grellier, M., Bareille, R., Bourget, C., Amédée, J. Responsiveness of human bone marrow stromal cells to shear stress. *J Tissue Eng Regen Med* 3, 302, 2009.
- [GRI06] Griffith, L.G., Swartz, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews : molecular cell biology* 7, 211, 2006.
- [GUT08] Guttierrez, R.A., Crumpler, E.T. Potential effect of geometry on wall shear stress distribution across scaffold surfaces. *Annals of biomedical engineering* 36, 77, 2008.
- [HAA00] Haapasalo, H., Kontulainen, S., Sievanen, H., Kannus, P., Jarvinen, M., Vuori, I. Exercise-induced bone gain is due to enlargement in bone size without a change of volumetric bone density : A peripheral quantitative computed tomography study of the upper arms of male tennis players. *Bone* 27, 351, 2000.
- [HOL05] Holtorf, H.L., Jansen, J.A., Mikos, A.G. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stromal cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. *J Biomed Mater Res A* 72A, 326, 2005.

- [HUG06] Hughes, F.J., Turner, W., Belibasakis, G., Martuscelli, G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology* 41, 48, 2006.
- [HUN13] Hung, B.P., Hutton, D.L., Grayson, W.L. Mechanical control of tissue-engineered bone. *Stem cell research & therapy* 4 : 10, 2013.
- [JAA08] Jaasma, M.J., O'Brien, F.J. Mechanical stimulation of osteoblasts using steady and dynamic fluid flow. *Tissue Engineering part A* 14, 1213, 2008.
- [JAN06] Janssen, F.W., Oostra, J., van Oorschot, A., van Blitterswijk, C.A. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone : In vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 27, 315, 2006.
- [JEA99] Jean, M. The non-smooth contact dynamics method. *Comput Methods Appl Mech Eng* 177, 235, 1999.
- [JOR04] Jorgensen, C., Gordeladze, J., Noel, D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Current opinion in biotechnology* 15, 406, 2004.
- [JUN09a] Jungreuthmayer, C., Jaasma, M.J., Al-Munajjed, A.A., Zanghellini, J., Kelly, D.J., O'Brien, F.J. Deformation simulation of cells seeded on a collagen-GAG scaffold in a flow perfusion bioreactor using a sequential 3D CFD-elastostatics model. *Med Eng Phys* 31, 420, 2009.
- [JUN09b] Jungreuthmayer, C., Donahue, S.W., Jaasma, M.J., Al-Munajjed, A.A., Zanghellini, J., Kelly, D.J., O'Brien, F.J. A comparative study of shear stresses in collagen-glycosaminoglycan and calcium phosphate scaffolds in bone tissue-engineering bioreactors. *Tissue Eng Part A* 15, 1141, 2009.
- [KAN07] Kanno, T., Takahashi, T., Tsujisawa, T., Ariyoshi, W., Nishihara, T. Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* 101, 1266, 2007.
- [KAW12] Kawai, M., Rosen, C.J. The insulin-like growth factor system in bone basic and clinical implications. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 41, 323, 2012.
- [KIM07] Kim, S.H., Choi, Y.R., Park, M.S., Shin, J.W., Park, K.D., Kim, S.J., Lee, J.W. ERK1/2 activation in enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells in poly (lactic-glycolic acid) by cyclic hydrostatic pressure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80, 826, 2007.
- [KLE98] Klein-Nulend, J., Helfrich, M.H., Sterck, J.G.H., MacPherson, H., Joldersma, M., Ralston, S.H., Semeins, C.M., Burger, E.H. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 108, 1998.

- [KNI05] Knippenberg, M., Helder, M.N., Doulabi, B.Z., Semeins, C.M., Wuisman, P., Klein-Nulend, J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Engineering* 11, 1780, 2005.
- [KNO98] Knothe, T.M.L., Niederer, P., Knothe, U. In vivo tracer transport through the lacunocanicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone* 22, 107, 1998.
- [KRA10] Kraft, D.C.E., Bindslev, D.A., Melsen, B., Abdallah, B.M., Kassem, M., Klein-Nulend, J. Mechanosensitivity of dental pulp stem cells is related to their osteogenic maturity. *European Journal of Oral Sciences* 118, 29, 2010.
- [KRE08] Kreke, M.R., Sharp, L.A., Lee, Y.W., Goldstein, A.S. Effect of intermittent shear stress on mechanotransductive signaling and osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 14, 529, 2008.
- [LAN93] Langer, R., Vacanti, J.P. *Tissue Engineering*. Science 260, 920, 1993.
- [LAR01] Dessin François Poulain - Archives Larousse. Larousse médical. http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Coupe_dun_os/1001990
- [LAR02] Photo CNRI - Archives Larousse. Larousse médical. http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Os_spongieux/1007285
- [LEE01] Lee, Y.M., Jeong, C.H., Koo, S.Y., Son, M.J., Song, H.S., Bae, S.K., Raleigh, J.A., Chung, H.Y., Yoo, M.A., Kim, K.W. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo : a possible signal for vessel development. *Developmental dynamics* 220, 175, 2001.
- [LES10] Lesman, A., Blinder, Y., Levenberg, S. Modeling of flow-induced shear stress applied on 3D cellular scaffolds: implications for vascular tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 105, 645, 2010.
- [LI04] Li, Y.J., Batra, N.N., You, L., Meier, S.C., Coe, I.A., Yellowley, C.E., Jacobs, C.R. Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Orthop Res* 22, 1283, 2004.
- [LIA01] Liao, C.J., Chen, C.F., Chen, J.H., Chiang, S.F., Lin, Y.J., Chang, K.Y. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *Journal of biomedical materials research* 59, 676, 2001.

- [LIU06] Liu, J., Liu, T., Zheng, Y., Zhao, Z., Liu, Y., Cheng, H., Luo, S., Chen, Y. Early responses of osteoblast-like cells to different mechanical signals through various signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348, 1167, 2006.
- [LIU09] Liu, J., Zhao, Z., Li, J., Zou, L., Shuler, C., Zou, Y., Huang, X., Li, M., Wang, J. Hydrostatic pressures promote initial osteodifferentiation with ERK1/2 not p38 MAPK signaling involved. *Journal of Cellular Biochemistry* 107, 224, 2009.
- [LIU11] Liu, L., Shao, L., Li, B., Zong, C., Li, J., Zheng, Q., Tong, X., Gao, C., Wang, J. Extracellular signal-regulated kinase1/2 activated by fluid shear stress promotes osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells through novel signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 1591, 2011.
- [LIU12] Liu, L., Yu, B., Chen, J., Tang, Z., Zong, C., Shen, D., Zheng, Q., Tong, X., Gao, C., Wang, J. Different effects of intermittent and continuous fluid shear stresses on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 11, 391, 2012.
- [MAE09] Maes, F., Van Ransbeeck, P., Van Oosterwyck, H., Verdonck, P. Modeling fluid flow through irregular scaffolds for perfusion bioreactors. *Biotechnology and bioengineering* 103, 621, 2009.
- [MAE12] Maes, F., Claessens, T., Moesen, M., Van Oosterwyck, H., Van Ransbeeck, P., Verdonck, P. Computational models for wall shear stress estimation in scaffolds : A comparative study of two complete geometries. *Journal of biomechanics* 45, 1586, 2012.
- [MAR01] Marie, P. Différentiation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/sciences synthèse* 17, 1252, 2001.
- [MAR07] Marcacci, M., Kon, E., Moukhachev, V., Lavroukov, A., Kutepov, S., Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair : 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Engineering* 13, 947, 2007.
- [MAR95] Martin, R.I., Brown, P.W. Mechanical properties of hydroxyapatite formed at physiological temperature. *Journal of materials science : materials in medicine* 6, 138, 1995.
- [MAS06] Mastrogiacomo, M., Scaglione, S., Martinetti, R., Dolcini, L., Beltrame, F., Cancedda, R., Quarto, R. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 27, 3230, 2006.

- [MCC10] McCoy, R.J. and O'Brien, F.J. Influence of Shear Stress in Perfusion Bioreactor Cultures for the Development of Three-Dimensional Bone Tissue Constructs: A Review. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 587, 2010.
- [MCC12] McCoy, R.J., Jungreuthmayer, C., O'Brien, F.J. Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 109, 1583, 2012.
- [MEI05] Meinel, L., Fajardo, R., Hofmann, S., Langer, R., Chen, J., Snyder, B., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 37, 688, 2005.
- [MEL11] Melchels, F.P.W., Tonnarelli, B., Olivares, A.L., Martin, I., Lacroix, D., Feijen, J., Wendt, D.J., Grijpma, D.W. The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding. *Biomaterials* 32, 2878, 2011.
- [MIL07] Milkiewicz, M., Doyle, J.L., Fudalewski, T., Ispanovic, E., Aghasi, M., Haas, T.L. HIF1-alpha and HIF-2alpha play a central role in stretch-induced but not shear-stress-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 583, 753, 2007.
- [MIL09] Milan, J.-L., Planell, J.A., Lacroix, D. Computational modelling of the mechanical environment of osteogenesis within a polylactic acid–calcium phosphate glass scaffold. *Biomaterials* 30, 4219, 2009.
- [MIS05] Mistry, A.S., Mikos, A.G. Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 34, 1, 2005.
- [MON08] Montse, C.H., Koch, M.A., Navarro, M., Lacroix, D., Engel, E., Planell, J.A. A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering : an in vitro study. *J Mater Sci : Mater Med* 19, 1503, 2008.
- [MOR78] Morey, E.J., Baylink, D.J. Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 201, 1138, 1978.
- [MUL06] Mullender, M.G., Dijcks, S.J., Bacabac, R.G., Semeins, C.M., Van Loon, J.J.W.A., Klein-Nulend J. Release of nitric oxide, but not prostaglandin E2, by bone cells depends on fluid flow frequency. *Journal of orthopaedic research* 24, 1170, 2006.
- [NIE13] Niemann, I., Hannemann, A., Nauck, M., Spielhagen, C., Völzke, H., Wallaschofski, H., Friedrich, N. The association between insulin-like growth factor I and bone turnover markers in the general adult population. *Bone* 56, 184, 2013.

- [OCE08] O’Cearbhaill, E.D., Punched, M.A., Murphy, M., Barry, F.P., McHugh, P.E., Burron, V. Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate. *Biomaterials* 29, 1610, 2008.
- [OLI09] Olivares, A.L., Marshal, E., Planell, J.A., Lacroix, D. Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. *Biomaterials* 30, 6142, 2009.
- [ORR08] Orr, D.E. and Burg, K.J.L. Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications. *Ann Biomed Eng* 36, 1228, 2008
- [PEL12] Pelaez, D., Arita, N., Cheung, H.S. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) dictates osteogenic and/or chondrogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells under dynamic compression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417, 1286, 2012.
- [PET00] Petite, H., Viateau, V., Bensaïd, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemain, G. *Nature biotechnology* 18, 959, 2000.
- [PHA12] Pham, N.H., Voronov, R.S., VanGordon, S.B., Sikavitsas, V.I., Papavassiliou, D.V. Predicting the stress distribution within scaffolds with ordered architecture. *Biorheology* 49, 235, 2012.
- [PHA14] Pham, N.H., Voronov, R.S., Tummala, N.R., Papavassiliou, D.V. Bulk stress distributions in the pore space of sphere-packed beds under Darcy flow conditions. *Phys Rev E* 89, 2014.
- [PIT99] Pittinger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143, 1999.
- [POR05] Porter, B., Zauel, R., Stockman, H., Guldberg, R., Fyhrie, D. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor. *J Biomech* 38, 543, 2005.
- [POR07] Porter, B.D., Lin, A.S.P., Peister, A., Hutmacher, D., Guldberg, R.E. Noninvasive image analysis of 3D construct mineralization in a perfusion bioreactor. *Biomaterials* 28, 2525, 2007.
- [PRE14] Press, T., Viale-Bouroncle, S., Felthaus, O., Gosau, M., Morsczeck C. EGR1 supports the osteogenic differentiation of dental stem cells. *International Endodontic Journal* 48, 185, 2015.
- [PRO97] Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71, 1997.

- [RAD09] Radjai, F., and Richefeu, V. Contact dynamics as a nonsmooth discrete element method. *Mech Mater* 41, 715, 2009.
- [RAI02] Raimondi, M.T., Boschetti, F., Falcone, L., Fiore, G.B., Remuzzi, A., Marinoni, E., Marazzi, M., Pietrabissa, R. Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment. *Biomech Model Mechanobiol* 1, 69, 2002.
- [REU11^a] Reumann, M.K., Strachna, O., Lukashova, L., Verdelis, K., Donnelly, E., Boskey, A.L., Mayer-Kuckuk P. Early growth response gene 1 regulates bone properties in mice. *Calcified Tissue International* 89, 1, 2011.
- [REU11^b] Reumann, M.K., Strachna, O., Yagerman, S., Torrecilla, D., Kim, J., Doty, S.B., Lukashova, L., Boskey, A.L., Mayer-Kuckuk, P. Loss of transcription factor early growth response gene 1 results in impaired endochondral bone repair. *Bone* 49, 743, 2011.
- [RHO98] Rho, J.Y., Kuhn-Spearing, L., Zioupos, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering & physics* 20, 92, 1998.
- [RUB03] Rubin, J., Murphy, T.C., Zhu, L.P., Roy, E., Nanes, M.S., Fan, X. Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2 MAPK. *Journal of biological chemistry* 278, 34018, 2003.
- [RUM08] Rumpler, M., Woesz, A., Dunlop, J.W.C., van Dongen, J.T., Fratzl, P. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *Journal of the royal society Interface* 5, 1173, 2008.
- [SAN08] Sandino, C., Planell, J.A., Lacroix, D. A finite element study of mechanical stimuli in scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomech* 41, 1005, 2008.
- [SAN09] Santos, A., Bakker, A.D., Zandieh-Doulabi, B., Semeins, C.M., Klein-Nulend, J. Pulsating fluid flow modulates gene expression of proteins involved in Wnt signaling pathways in osteocytes. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 27, 1280, 2009.
- [SCA08] Scaglione, S., Wendt, D., Miggino, S., Papadimitropoulos, A., Fato, M., Quarto, R., Martin, I. Effects of fluid flow and calcium phosphate coating on human bone marrow stromal cells cultured in a defined 2D model system. *J Biomed Mater Res A* 86A, 411, 2008.
- [SHA09] Shrap, L.A., Lee, Y.W., Goldstein, A.S. Effect of low frequency pulsatile flow on expression of osteoblastic genes by bone marrow stromal cells. *Annals of Biomedical Engineering* 37, 445, 2009.
- [SIK01] Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., Mikos, A.G. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 22, 2581, 2001.

- [SIK03] Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N., Holtorf, H.L., Jansen, J.A., Mikos, A.G. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14683, 2003.
- [SIK05] Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N., Lemoine, J.J., Liebschner, M.A.K., Dauner, M., Mikos, A.G. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* 33, 63, 2005.
- [SIM03] Simmons, C.A., Matlis, S., Thornton, A.J., Chen, S., Wang, C.Y., Mooney, D.J. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *Journal of Biomechanics* 36, 1087, 2003.
- [SMA97] Smalt, R., Mitchell, F.T., Howard, R.L., Chambers, T.J. Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273, E751, 1997.
- [STO09] Stolberg, S., McCloskey, K.E. Can shear stress direct stem cell fate ? *Biotechnol. Prog.* 25, 10, 2009.
- [STR02] Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V., Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J.L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H.P., Carano, R.A.D., Filvaroff, E.H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9656, 2002.
- [TAN05] Tanaka, S.M., Sun, H.B., Roeder, R.K., Burr, D.B., Turner, C.H., Yokota, H. Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix. *Calcif Tissue Int* 76, 261, 2005.
- [THI07] Thi, M.M., Iacobas, D.A., Iacobas, S., Spray, D.C. Fluid shear stress upregulates vascular endothelial growth factor gene expression in osteoblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1117, 73, 2007.
- [TIT10] Titushkin, I., Sun, S., Shin, J., Cho, M. Physiochemical control of adult stem cell differentiation : shedding light on potential molecular mechanisms. *Journal of biomedicine and biotechnology* 2010, 1, 2010.
- [TJA06] Tjabringa, G.S., Vezeridis, P.S., Zandieh-Doulabi, B., Helder, M.N., Wuisman, P.I.J.M., Klein-Nulend, J. Polyamines modulate nitric oxide production and COX-2 gene expression in response to mechanical loading in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 2262, 2006.

- [VAN05] Vance, J., Galley, S., Liu, D.F., Donahue, S.W. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release. *Tissue Engineering* 11, 1832, 2005.
- [VAN11] VanGordon, S.B., Voronov, R.S., Blue, T.B., Shambaugh, R.L., Papavassiliou, D.V., Sikavitsas, V.I. Effects of scaffold architecture on preosteoblastic cultures under continuous fluid shear. *Ind Eng Chem Res* 50, 620, 2011.
- [VET13] Vetsch, J.R., Müller R, Hofmann, S. The evolution of simulation techniques for dynamic bone tissue engineering in bioreactors. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2013.
- [VIA07] Viateau, V., Guillemin, G., Bousson, V., Oudina, K., Hannouche, D., Sedel, L., Logeart-Avromoglou, D., Petite, H. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts : A study on sheep. *Journal of orthopaedic research* 25, 741, 2007.
- [VOR10^a] Voronov, R., VanGordon, S., Sikavitsas, V.I., Papavassiliou, D.V. Computational modeling of flow-induced shear stresses within 3D salt-leached porous scaffolds imaged via micro-CT. *Journal of biomechanics* 43, 1279, 2010.
- [VOR10^b] Voronov, R.S., VanGordon, S.B., Sikavitsas, V.I., Papavassiliou, D.V. Distribution of flow-induced stresses in highly porous media. *Appl Phys Lett* 97, 2010.
- [WAN11] Wang, Y., Li, Y., Fan, X., Zhang, Y., Wu, J., Zhao, Z. Early proliferation alteration and differential gene expression in human periodontal ligament cells subjected to cyclic tensile stress. *Archives of Oral Biology* 56, 177, 2011.
- [WAR07] Ward, D.F., Salaszyk, R.M., Klees, R.F., Backiel, J., Agius, P., Bennett, K., Boskey, A., Plopper, G.E. Mechanical strain enhances extracellular matrix-induced gene focusing and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through an extracellular-related kinase-dependent pathway. *Stem Cells and Development* 16, 467, 2007.
- [WEI94] Weinbaum, S., Cowin, S.C., Zeng, Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* 27, 339, 1994.
- [WOL92] Wolff, J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. 1892. Traduction anglaise : Wolff, J. *The Law of Bone Remodelling*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1986.
- [YAN11] Yan, X., Chen, X.B., Bergstrom, D.J. Modeling of the flow within scaffolds in perfusion bioreactors. *American journal of biomedical engineering* 1, 72, 2011.
- [YEA11^a] Yeatts, A.B. and Fisher, J.P. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 337, 2011.

- [YEA11^b] Yeatts, A.B., Gordon, C.N., Fisher, J.P. Formation of an aggregated alginate construct in a tubular perfusion system. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 1171, 2011.
- [YEA13] Yeatts, A.B., Choquette, D.T., Fisher, J.P. Bioreactors to influence stem cell fate : augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 2470, 2013.
- [YI10] Yi, W., Sun, Y., Wei, X, Gu, C., Dong, X., Kang, X., Guo, S., Dou, K. Proteomic profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells under shear stress. *Mol Cell Biochem* 341, 9, 2010.
- [YIM05] Yim, E.K., Reano, R.M., Pang, S.W., Yee, A.F., Chen, C.S., Leong, K.W. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials* 26, 5405, 2005.
- [YOU01] You, J., Reilly, G.C., Zhen, X.C., Yellowley, C.E., Chen, Q., Donahue, H.J., Jacobs, C.R. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of biological chemistry* 276, 13365, 2001.
- [ZER14] Zermatten, E., Vetsch, J.R., Ruffoni, D., Hofmann, S., Müller, R., Steinfeld, A. Micro-computed tomography based computational fluid dynamics for the determination of shear stresses in scaffolds within a perfusion bioreactor. *Ann Biomed Eng* 42, 1085, 2014.
- [ZER98] Zerwekh, J.E., Ruml, L.A., Gottschalk, F., Pak, C.Y.C. The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects. *Journal of bone and mineral research* 13, 1594, 1998.
- [ZHA07] Zhao, F., Chella, R., Ma, T. Effects of shear stress on 3-D human mesenchymal stem cell construct development in a perfusion bioreactor system: Experiments and hydrodynamic modelling. *Biotechnol Bioeng* 96, 584, 2007.
- [ZUK02] Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13, 4279, 2002.

Liste des figures

Figure 0 Nombre de publications répertoriées par Web of Science dont le résumé contient les mots « tissue engineering », année par année	5
Figure I-1 Coupe de la partie proximale d'un fémur humain.....	12
Figure I-2 Coupe schématique d'un os présentant la structure ostéonale de l'os cortical et la structure spongieuse de l'os trabéculaire.....	12
Figure I-3 Photographie au microscope optique d'un ostéon issu d'un échantillon d'os humain.....	13
Figure I-4 Organisation hiérarchique de l'os à différentes échelles.....	14
Figure I-5 Travées osseuses d'os trabéculaire dont la direction est adaptée au chargement mécanique	14
Figure I-6 Photographie au microscope optique de CSM humaines cultivées en laboratoire.....	15
Figure I-7 Différentes voies de différenciation possibles pour les CSM.....	16
Figure I-8 Le cycle du remodelage osseux.....	18
Figure I-9 Schéma de principe de l'ingénierie tissulaire osseuse et de ses différentes étapes	26
Figure I-10 Images radiographiques des métatarsiens de brebis, 16 semaines après la résection et l'implantation ou non d'un matériau de comblement	29
Figure I-11 Coupes obtenues au microscanner des métatarsiens de brebis, 16 semaines après la résection et l'implantation ou non d'un matériau de comblement	29
Figure II-1 Schéma de principe du système développé au laboratoire pour exposer les cellules à une compression hydrostatique	49
Figure II-2 Schéma du système Ibidi utilisé pour exposer les cellules à une contrainte de cisaillement	50
Figure II-3 Effets du cisaillement et de la compression hydrostatique sur la production de monoxyde d'azote par les CSM humaines.....	55
Figure II-4 Expression d'une sélection de gènes 0h, 1h et 6h après exposition des CSM humaines à un cisaillement ou à une compression hydrostatique	57
Figure II-5 Activation de ERK1/2 en réponse des CSM humaines au cisaillement ou à la compression	59
Figure II-6 Preuve qualitative de l'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK1/2 dans les CSM humaines exposées au cisaillement.....	63
Figure III-1 Représentation schématique du modèle discrétisé en (a) 50 tranches dans la direction verticale (b) 20 anneaux dans la direction radiale	74
Figure III-2 Lignes de courant obtenues pour un empilement de chaque configuration à 200 mL/min	76
Figure III-3 Cisaillement aux parois obtenu pour un empilement de chaque configuration à chaque flux d'entrée.....	77
Figure III-4 Cisaillement moyen aux parois pour chaque configuration et chaque flux	78
Figure III-5 Distribution du cisaillement aux parois pour chaque configuration et chaque flux.....	79
Figure III-6 Fonctions densité de probabilité du cisaillement aux parois adimensionnalisés pour chaque configuration	81

Figure III-7 Hétérogénéité radiale obtenue pour chaque configuration et chaque flux.....	82
Figure IV-1 Particules cubiques et sphériques de corail <i>Acropora Florida</i>	92
Figure IV-2 Bille et cube de corail <i>Acropora Florida</i> ensemencés de cellules souches mésenchymateuses colorées « GFP » et observés au microscope à fluorescence	93
Figure IV-3 Bioréacteurs pendant une expérience de flux, avec les pompes péristaltiques, le système de tubulure et le réservoir de milieu de culture	94
Figure IV-4 Expression des gènes mécanosensibles dans la configuration C2bille ^{exp} en statique et avec la séquence de stimulation 3*150 mL/min	96
Figure IV-5 Expression du gène PTGS2 dans la configuration C2bille ^{exp} en statique, à 1*150 mL/min et à 3*150 mL/min	97
Figure IV-6 Expression du gène PTGS2 dans les différentes configurations géométriques dans le cas de la séquence de stimulation à 3*150 mL/min	98
Figure IV-7 Expression du gène PTGS2 dans les différentes configurations géométriques dans le cas de la séquence de stimulation de 3h30 à 10 mL/min.....	99
Figure IV-8 Comparaison des résultats expérimentaux et numériques	100
Figure V-1 Dispositif de cisaillement développé	108
Figure V-2 Lames ensemencées de corail de bénitier et de polystyrène dans une boîte stérile	110
Figure V-3 Dispositif pendant une expérience de cisaillement sur une lame de corail de bénitier	111
Figure V-4 Plaque de puits pour analyse Elisa avant la dernière étape de mesure de la densité optique	112
Figure V-5 Image obtenue en microscopie confocale multiphotonique lors de l'observation d'une lame de corail de bénitier ensemencée avec des CSM humaines.....	115
Figure V-6 Induction de la phosphorylation de ERK1/2 au sein des cellules ensemencées sur lames de polystyrène en fonction du cisaillement appliqué pendant 30 minutes	116
Figure V-7 Induction de la phosphorylation de ERK1/2 au sein des cellules ensemencées en flasques et sur lames de corail en fonction du cisaillement appliqué pendant 30 minutes.....	117
Figure V-8 Expression génique mesurée par RT-PCR par des CSM ensemencées sur lame de corail de bénitier, en fonction du cisaillement appliqué.....	118
Figure V-9 Expression génique mesurée par RT-PCR par des CSM ensemencées sur lame de polystyrène, en fonction du cisaillement appliqué	118

Liste des tableaux

Tableau I-1 Etudes sur les effets du cisaillement sur CSM humaines en 2D en fonction du niveau et de la durée de stimulation	23
Tableau I-2 Etudes numériques réalisées sur différents scaffolds pour évaluer les niveaux de cisaillement aux parois	39
Tableau III-1 Porosité, taille des pores et pentes S_w obtenues pour différents scaffolds de la littérature et de cette étude	83
Tableau IV-1 Etudes expérimentales portant sur des cultures de cellules souches mésenchymateuses de différentes espèces ensemencées sur des scaffolds granulaires et effet de la perfusion.....	90
Tableau V-1 Photographies au microscope optique des CSM humaines en culture au fur et à mesure de leur croissance en flasque de culture	114

Résumé

L'ingénierie tissulaire osseuse a récemment connu de nouveaux développements grâce à la prise en compte du phénomène de mécanotransduction dans la conception des bioréacteurs. Toutefois, des progrès restent à faire sur nos connaissances sur les mécanismes de la réponse des cellules souches mésenchymateuses (CSM) aux contraintes mécaniques en vue d'optimiser l'environnement mécanique tridimensionnel des cellules dans les bioréacteurs.

L'objectif de cette thèse est double : déterminer le meilleur microenvironnement mécanique pour des CSM humaines et appliquer cet environnement au sein d'un bioréacteur. Pour cela, des CSM humaines ont été cultivées dans différentes conditions et soumises à des contraintes mécaniques. Leur réponse a été analysée via des marqueurs précoces de l'ostéogénèse. En parallèle, un modèle numérique a été développé pour simuler l'écoulement dans un bioréacteur à scaffold granulaire et déterminer le niveau et la répartition des contraintes ressentis par les cellules. Il a été mis en évidence que la réponse des cellules à une stimulation mécanique dépend très fortement de son environnement tridimensionnel.

Ce travail à la fois mécanique et biologique permet de dégager des pistes d'amélioration des bioréacteurs et des scaffolds en vue de l'optimisation de l'environnement mécanique tridimensionnel des cellules en ingénierie tissulaire osseuse.

Mots clés : Ingénierie tissulaire osseuse, cisaillement, mécanotransduction, bioréacteur, modélisation, dynamique des fluides, scaffolds granulaires

Abstract

Bone tissue engineering is currently in full development and a growing field of research. The consideration of the mechanotransduction process is a key factor in the optimization of bioreactors. Mesenchymal stem cells (MSC) used in bone tissue engineering are known to be mechanosensitive but our knowledge of the mechanisms of cell response to mechanical stress needs to be improved.

This thesis has a double goal: determining the best possible mechanical microenvironment for human MSC, and apply this environment in a bioreactor. To that aim, human MSC were grown in different conditions and subjected to mechanical stresses. Their response was analyzed through osteogenesis markers. A numerical model was also implemented to simulate the flow in bioreactor with a granular scaffold and evaluate levels and distributions of stresses felt by cells. It was shown that cell response to mechanical stress is strongly dependent on the tridimensional environment.

This biological and mechanical study highlights tracks of improvement for bioreactors and scaffolds to optimize the mechanical tridimensional environment of cells in bone tissue engineering.

Key-words: Bone tissue engineering, shear stress, mechanotransduction, bioreactor, modeling, computational fluid dynamics, granular scaffolds