# Rôle des phénomènes de transport dans la mise au point de stratégies thérapeutiques de réparation osseuse

Sarah Lemonnier

▶ **To cite this version:**

Sarah Lemonnier. Rôle des phénomènes de transport dans la mise au point de stratégies thérapeutiques de réparation osseuse. Autre. Université Paris-Est, 2014. Français. NNT : 2014PEST1031 . tel-01124270

**HAL Id: tel-01124270**
**https://theses.hal.science/tel-01124270**

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

# Université Paris-Est

*Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie et Environnement*

# THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

## Docteur de l'Université Paris-Est

Spécialité : Mécanique, Biomécanique

Par


## Sarah LEMONNIER


# Rôle des phénomènes de transport dans la mise au point de stratégies thérapeutiques de réparation osseuse

Soutenue publiquement le 08 avril 2014

Composition du jury :

| | | |
|---|---|---|
| Mr Olivier BOIRON | Professeur<br>Ecole Centrale Marseille, Marseille | rapporteur |
| Mr Lalaonirina RAKOTOMANANA | Professeur<br>Université de Rennes 1, Rennes | rapporteur |
| Mme Joëlle AMÉDÉE-VILAMITJANA | Directrice de recherche à l'INSERM<br>Université Bordeaux Segalen, Bordeaux | examinatrice, présidente |
| Mme Patricia ALBANESE | Maître de conférences<br>Université Paris-Est Créteil, Créteil | examinatrice |
| Mr Thibault LEMAIRE | Professeur<br>Université Paris-Est Créteil, Créteil | co-encadrant |
| Mr Salah NAILI | Professeur<br>Université Paris-Est Créteil, Créteil | directeur |


Laboratoire Modélisation et Simulation Multi Echelle, MSME UMR 8208 CNRS, Université Paris-Est,
61, avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex - FRANCE

# Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Professeur Salah Naili, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et avoir dirigé ce travail de thèse. Merci pour votre temps et vos conseils avisés.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail : Lalaonirina Rakotomanana et Olivier Boiron en tant que rapporteurs ; Joëlle Amédée-Vilamitjana, Patricia Albanèse, Thibault Lemaire et Salah Naili comme examinateurs.

Je voudrais remercier tout particulièrement mon encadrant, Monsieur Thibault Lemaire, avec qui travailler durant ces trois années a été un réel plaisir. Merci pour ton temps, ta patience et ta bienveillance, et pour toutes ces discussions, scientifiques et autres. Merci aussi pour mon début de culture cinématographique...

La part expérimentale de cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans l'aimable soutien du laboratoire Croissance, Réparation et Régénération Tissulaire (CRRET) de l'université Paris-Est Créteil. Merci à son directeur José Courty de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Merci également à Patricia Albanèse d'avoir veillé à ce que je puisse travailler dans les meilleures conditions. Un grand merci à mon "binôme" Thibault Bouderlique de m'avoir formée aux techniques de culture cellulaire et pour son aide précieuse lors des premières étapes de la mise en place du protocole expérimental. Enfin, je tiens à remercier l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil, et d'avoir toujours répondu avec gentillesse à mes questions de novice.

I am very thankful to Professor Melissa Knothe Tate for the amazing opportunity to spend three months in her team during the summer of 2012. Thank you for your trust, our fruitful discussions and your kind words. I have really enjoyed working with you.

I would also like to thank warmly Shannon, Hana, Sarah, Stephanie, Jonathan and everyone that has made this experience inside and outside the lab a memorable time. I miss you all and I will be back !

De nombreuses personnes ou institutions ont également contribué à cette étude, par leur soutien matériel ou technique. Je voudrais ainsi remercier la Direction Générale de l'Armement (DGA) d'avoir financé cette thèse ; l'école doctorale Sciences, Ingénierie et Environnement de l'Université Paris-Est et son directeur Denis Duhamel d'avoir financé ma mission aux Etats-Unis ; l'Etablissement Français du Sang et plus particulièrement Hélène Rouard et Nathalie Chevalier qui ont gracieusement mis à ma disposition les cellules souches mésenchymateuses utilisées dans ce travail ; l'entreprise CERAVER et Bertrand De Lambert de nous avoir donné les biomatériaux utilisés dans cette étude ; l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est et Michel Laroche et Léon Preira pour leur aide technique lors de la réalisation du dispositif expérimental, et le Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA) pour les images obtenues par microscopie électronique à balayage.

Je tiens par ailleurs à remercier l'ensemble des personnes au sein du laboratoire ou de la faculté qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à l'élaboration de cette thèse, et en particulier Henriette Peyrat et Hung-Son Phan pour leur aide précieuse.

Merci également à Romain, Joanna, Vincent, Adrien et Séraphin pour leur aide et ces bons moments passés ensemble au cours de ces trois ans, en espérant qu'il y en ait beaucoup d'autres !

Enfin, je voudrais remercier ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille et leur présence, y compris durant mes périodes d'"hibernation". Merci pour tout ce que vous m'apportez. Je sais la chance que j'ai de vous avoir.

# Table des matières

**1 Fractures critiques et réparation osseuse** **3**

1.1 Les os et leur structure . . . . . 4

1.1.1 Différents types d'os . . . . . 5

1.1.2 Les cellules mises en jeu . . . . . 7

1.1.3 Le périoste . . . . . 10

1.2 Les différents mécanismes de réparation osseuse . . . . . 11

1.2.1 Le remodelage osseux . . . . . 12

1.2.2 La cicatrisation osseuse . . . . . 14

1.3 Absence de consolidation et fractures critiques . . . . . 17

1.3.1 L'absence de consolidation . . . . . 17

1.3.2 Les fractures critiques ou de grande taille . . . . . 18

1.3.3 Traitements actuels . . . . . 19

1.3.4 Bilan . . . . . 22

1.4 L'ingénierie tissulaire osseuse . . . . . 23

1.4.1 Principe de l'ingénierie tissulaire . . . . . 23

1.4.2 Les cellules . . . . . 25

1.4.3 Les biomatériaux . . . . . 26

1.4.4 Les bioréacteurs et les facteurs de croissance . . . . . 28

1.4.5 Bilan . . . . . 31

1.5 Le cas du périoste . . . . . 32

1.6 Conclusion . . . . . 34

**2 Phénomènes de transport au sein du tissu osseux** **37**

2.1 Perméabilité intrinsèque et taille de pore . . . . . 41

2.1.1 La loi de Kozeny-Carman . . . . . 41

2.1.2 Estimations correspondantes de la taille des pores lacuno-canaliculaires . . 44

2.2 Perméabilité intrinsèque et structure géométrique des pores . . . . . 46

2.2.1 Méthode . . . . . 47

2.2.2 Ecoulement du fluide au sein d'un pore . . . . . 49

2.2.3 Conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ et structure géométrique des pores . . . . . 51

2.2.4 Détermination de la perméabilité intrinsèque lacuno-canaliculaire $\kappa$ . . . . 53

2.3 Discussion . . . . . 54

2.3.1 Analyse des estimations de $\kappa$ issues de notre étude numérique . . . . . 54

2.3.2 Limites de cette approche numérique . . . . . 57

2.3.3 Limites possibles des méthodes expérimentales actuelles . . . . . 58

2.3.4 Phénomènes électrochimiques au sein de l'os cortical . . . . . 60

2.4 Application à l'ingénierie tissulaire : le problème de la fin de culture . . . . . 63

2.4.1 Méthode . . . . . 65

2.4.2 Résultats et discussion . . . . . 69

2.4.3 Conclusion . . . . . 71

2.5 Conclusion . . . . . 72

**3 Colonisation cellulaire d'un biomatériau céramique de grande taille** **73**

3.1 Matériel et méthodes . . . . . 77

3.1.1 Protocole de test . . . . . 77

3.1.2 Méthode de comptage utilisée . . . . . 83

3.2 Résultats . . . . . 87

3.2.1 Influence de la densité cellulaire et de la nature du chargement . . . . . 87

3.2.2 Influence des autres paramètres . . . . . 90

3.3 Répartition au sein de l'implant : influence de la structure . . . . . 94

3.3.1 Variabilité des échantillons . . . . . 94

3.3.2 Répartition des cellules . . . . . 95

3.3.3 Les limites des protocoles d'ensemencement . . . 101
3.4 Conclusion . . . 104

**4 Etude numérique des étapes d'ensemencement et de prolifération cellulaires 107**

4.1 Modèle proposé . . . 111
4.1.1 Configuration géométrique . . . 111
4.1.2 Ecoulement du fluide . . . 112
4.1.3 Interactions fluide/cellules . . . 114
4.1.4 Transport des espèces chimiques . . . 117
4.1.5 Prolifération cellulaire . . . 118
4.1.6 Bilan . . . 121
4.2 Résolution numérique . . . 122
4.2.1 Géométrie modélisée . . . 122
4.2.2 Simulation de l'ensemencement cellulaire . . . 125
4.2.3 Simulation de la prolifération cellulaire . . . 129
4.3 Résultats pour l'étape d'ensemencement cellulaire . . . 131
4.4 Résultats pour l'étape de prolifération cellulaire . . . 136
4.4.1 Influence du cisaillement . . . 138
4.4.2 Influence de la concentration en oxygène . . . 140
4.4.3 Influence de la concentration en glucose . . . 142
4.5 Conclusion et perspectives . . . 145

**5 Etude des propriétés de transport du périoste 149**

5.1 Matériel et méthodes . . . 151
5.1.1 Préparation des solutions à perfuser . . . 151
5.1.2 Préparation des échantillons . . . 152
5.1.3 Tests de perméabilité . . . 154
5.2 Résultats . . . 155
5.2.1 Influence du site anatomique de prélèvement . . . 155
5.2.2 Influence du niveau de concentration de la solution perfusante . . . 156
5.3 Discussion . . . 157

5.3.1 Influence de la couche fibreuse . . . . . 158
5.3.2 Influence de la couche cellulaire . . . . . 160
5.3.3 Rôle des fibres de Sharpey . . . . . 161
5.3.4 Influence de la salinité de la solution perfusante . . . . . 162
5.4 Conclusion . . . . . 162

**Annexes** **199**

Annexe A : Analyse de sensibilité des paramètres utilisés lors de la détermination de la loi $\kappa_{HP} = f(\delta)$ . . . . . 201
Annexe B : Données expérimentales issues des tests d'ensemencement cellulaire . . . . 203
Annexe C : Analyse de sensibilité des paramètres utilisés lors des tests expérimentaux d'ensemencement cellulaire . . . . . 205
Annexe D : Coupe histologique d'un échantillon en TCP$\beta$ après ensemencement cellulaire 207
Annexe E : Tests expérimentaux d'osmose sur des échantillons de périoste fémoral ovin . 217

# Table des symboles

## Opérateurs mathématiques et fonctions

| | |
|---|---|
| $\nabla$ | Différenciation spatiale |
| $attach$ | Probabilité d'adhésion cellulaire globale |
| $attach_cisaill$ | Probabilité d'adhésion cellulaire due aux effets de cisaillement |
| $attach_paroi$ | Probabilité de contact avec la paroi du domaine fluide |
| $cell$ | Nombre total de cellules greffées dans chaque pore |
| $cell_{att}$ | Nombre de cellules se greffant à chaque pore à chaque intervalle de temps |
| $cell_{ent}$ | Nombre de cellules entrant dans chaque pore à chaque intervalle de temps |
| $cell_{trans}$ | Nombre de cellules transmises aux pores aval à chaque intervalle de temps |
| $cell_{trav}$ | Nombre de cellules traversant le pore sans toucher sa paroi à chaque intervalle de temps |
| $detach_cisaill$ | Probabilité de perte d'adhésion cellulaire |
| $prolif$ | Taux de prolifération cellulaire effectif |
| $prolif_cisaill$ | Influence des effets de cisaillement sur la prolifération cellulaire |
| $prolif_i$ | Influence de $C_i$ sur la prolifération cellulaire |

## Constantes et variables

| | | |
|---|---|---|
| $A$ | Surface spécifique | [$m^{-1}$] |
| $A_{fs}$ | Aire de l'interface fluide/solide | [$m^2$] |
| $\alpha$ | Facteur de forme du réseau poreux | [–] |

| | | |
|---|---|---|
| $\alpha_{cell}$ | Taux de prolifération maximal des CSM | [cell.s$^{-1}$] |
| $c$ | Paramètre de Kozeny | [–] |
| $C$ | Concentration chimique totale | [mol.m$^{-3}$] |
| $C_i$ | Concentration de l'espèce chimique $i$ | [mol.m$^{-3}$] |
| $C_{i,0}$ | Concentration initiale de l'espèce chimique $i$ | [mol.m$^{-3}$] |
| $cell_tot$ | Nombre total de cellules injectées | [cell] |
| $d_{cell}$ | Masse volumique des cellules | [kg.m$^{-3}$] |
| $d$ | Diamètre des sphères solides (loi de Kozeny-Carmann) | [m] |
| $d_{fl}$ | Distance perfusée | [m] |
| $Da$ | Nombre de Damköhler | [-] |
| $D_i$ | Coefficient de diffusion de l'espèce chimique $i$ | [m$^2$.s$^{-1}$] |
| $D_{LF}$ | Distance fibre à fibre (matrice péricellulaire) | [m] |
| $\delta$ | Taille caractéristique de pore | [m] |
| $\Delta$ | Distance fibre à fibre utilisée dans l'étude de Weinbaum et al. [265] | [m] |
| $\Delta cell$ | Nombre de cellules entrant dans le montage à chaque intervalle de temps | [cell] |
| $\Delta P$ | Variation de pression le long du canalicule | [Pa] |
| $\Delta t$ | Intervalle de temps séparant deux simulations | [s] |
| $\Delta V_{MEC}$ | Volume de MEC produit pendant l'intervalle de temps $\Delta t$ | [m$^3$] |
| $\Delta V_{MEC,p2}$ | Volume de MEC produit dans le pore 2 pendant $\Delta t$ après un ensemencement à $5$mm.s$^{-1}$ | [m$^3$] |
| $e$ | Indice des vides (loi de Kozeny-Carmann) | [–] |
| $e_i$ | Directions de l'espace | [–] |
| $E$ | Champ électrique | [V.m$^{-1}$] |
| $\varepsilon$ | Permittivité électrique du milieu | [A.s.V$^{-1}$.m$^{-1}$] |
| $\varepsilon_0$ | Permittivité électrique du vide | [A.s.V$^{-1}$.m$^{-1}$] |
| $\varepsilon_r$ | Permittivité électrique relative du fluide | [-] |
| $F$ | Constante de Faraday | [C.mol$^{-1}$] |
| $F_R$ | Force de résistance exercée par l'échantillon sur le piston | [N] |
| $h$ | Demi-hauteur du pore plan modélisé | [m] |

| | | |
|---|---|---|
| $\boldsymbol{I}$ | Tenseur identité d'ordre 3 | |
| $k$ | Paramètre de Kozeny modifié | [–] |
| $k_i$ | Constante de Michaelis-Menten pour le couple (CSM, espèce chimique $i$) | [mol.m$^{-3}$] |
| $K_{M,glu}$ | Constante de Monod pour le couple (CSM, glucose) | [mol.m$^{-3}$] |
| $\kappa$ | Perméabilité intrinsèque | [m$^2$] |
| $\kappa_C$ | Perméabilité due aux effets osmotiques | [m$^5$.mol$^{-1}$s$^{-1}$] |
| $\kappa_E$ | Perméabilité due aux effets électro-osmotiques | [m$^2$.s$^{-1}$] |
| $\kappa_H$ | Perméabilité due aux effets hydrauliques | [m$^2$.Pa$^{-1}$.s$^{-1}$] |
| $\kappa_{HP}$ | Conductivité hydraulique de Hagen-Poiseuille | [m$^2$] |
| $l$ | Longueur du pore (à l'échelle microscopique) | [m] |
| $L$ | Longueur du milieu poreux (à l'échelle macroscopique) | [m] |
| $L_D$ | Longueur de Debye | [m] |
| $\mu_f$ | Viscosité du fluide | [Pa.s] |
| $N_F$ | Nombre de fibres péricellulaires par section transverse | [–] |
| $n_S$ | Normale sortante à la paroi du domaine fluide | [–] |
| $q_{glu,conso}$ | Taux de consommation total de glucose | [mol.s$^{-1}$] |
| $q_{glu,entrant}$ | Apport de glucose dû au transport convectif | [mol.s$^{-1}$] |
| $Q$ | Flux volumique de fluide | [m$^3$.s$^{-1}$] |
| $Q_i$ | Flux surfacique de l'espèce chimique $i$ | [mol.m$^{-2}$.s$^{-1}$] |
| $P$ | Pression | [Pa] |
| $Pe$ | Nombre de Péclet | [-] |
| $r_C$ | Rayon de courbure des lignes de courant de l'écoulement principal | [m] |
| $R$ | Constante des gaz parfaits | [J.mol$^{-1}$.K$^{-1}$] |
| $R_C$ | Rayon du canalicule | [m] |
| $R_{cell}$ | Rayon d'une cellule | [m] |
| $R_F$ | Rayon des fibres péricellulaires | [m] |
| $R_H$ | Rayon hydraulique du pore | [m] |
| $R_i$ | Taux de consommation cellulaire de l'espèce chimique $i$ | [mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$] |
| $R_{i,max}$ | Taux de consommation cellulaire maximal de l'espèce chimique $i$ | [mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$] |

| | | |
|---|---|---|
| $R_O$ | Rayon de la dendrite de l'ostéocyte | [m] |
| $R_{ox,H}$ | Taux de consommation cellulaire d'oxygène des CSM et des ostéoblastes | [mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$] |
| $R_{ox,L}$ | Taux de consommation cellulaire d'oxygène des chondrocytes | [mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$] |
| $R_p$ | Rayon du pore | [m] |
| $Re$ | Nombre de Reynolds | [–] |
| $\rho_{cell}$ | Densité volumique de cellules | [cell.m$^{-3}$] |
| $\rho_f$ | Masse volumique du fluide | [kg.m$^{-3}$] |
| $S$ | Aire de la section droite du milieu poreux étudié | [m$^2$] |
| $S_{att}$ | Aire de l'interface fluide/solide disponible pour la colonisation cellulaire | [m$^2$] |
| $S_c$ | Aire de la section droite de la chambre d'écoulement | [m$^2$] |
| $S_{conn}$ | Aire de la section droite des connexions avec les pores aval | [m$^2$] |
| $S_f$ | Aire de la fraction fluide de la section droite du milieu poreux | [m$^2$] |
| $S_{f,loc}$ | Aire de la fraction fluide de la section droite du domaine modélisé | [m$^2$] |
| $\boldsymbol{\sigma}$ | Tenseur des contraintes s'exerçant dans le fluide | |
| $\sigma_{cell}$ | Densité surfacique de cellules | [cell.m$^{-2}$] |
| $\sigma_{cell,p2}$ | Densité surfacique de cellules dans le pore 2 après ensemencement à $5$mm.s$^{-1}$ | [cell.m$^{-2}$] |
| $\sigma_{conf}$ | Densité surfacique de cellules correspondant au stade de confluence | [cell.m$^{-2}$] |
| $\sigma_{elec}$ | Densité surfacique de charges | [C.m$^{-2}$] |
| $\boldsymbol{\sigma}_f$ | Tenseur des contraintes liées aux effets de cisaillement | |
| $t$ | Temps | [s] |
| $t_{fl}$ | Durée de la perfusion de fluide | [s] |
| $T$ | Température | [K] |
| $T_{inj}$ | Durée de l'injection | [s] |
| $\tau$ | Contrainte de cisaillement induite par l'écoulement du fluide | [Pa] |
| $\tau_i$ | Contrainte de cisaillement seuil dans les mécanismes d'adhésion cellulaire | [Pa] |
| $\theta$ | Tortuosité | [–] |

| | | |
|---|---|---|
| $\overline{\varphi}$ | Potentiel électrique de la double couche réduit (voir Lemaire et al. [148] | [V] |
| $\psi$ | Potentiel électrique | [V] |
| $v$ | Vitesse locale du fluide (à l'échelle microscopique) | [m.s$^{-1}$] |
| $v_{D,moy}$ | Vitesse moyenne apparente du glucose liée aux effets de diffusion | [m.s$^{-1}$] |
| $v_T$ | Vitesse locale secondaire dans le plan transverse à la direction principale de l'écoulement | [m.s$^{-1}$] |
| $v_{T,moy}$ | Valeur moyenne de $v_T$ | [m.s$^{-1}$] |
| $V$ | Volume du milieu poreux étudié | [m$^3$] |
| $V_D$ | Vitesse moyenne macroscopique du fluide (vitesse de Darcy) | [m.s$^{-1}$] |
| $V_E$ | Vitesse d'écoulement du fluide due aux effets électro-osmotiques | [m.s$^{-1}$] |
| $V_f$ | Volume du domaine fluide | [m$^3$] |
| $V_H$ | Vitesse d'écoulement à atteindre lors de la culture de CSM ou d'ostéoblastes | [m.s$^{-1}$] |
| $V_{in}$ | Vitesse moyenne de perfusion | [m.s$^{-1}$] |
| $V_L$ | Vitesse d'écoulement à atteindre lors de la culture de chondrocytes | [m.s$^{-1}$] |
| $V_{MEC}$ | Volume de matrice extracellulaire | [m$^3$] |
| $V_P$ | Vitesse d'écoulement du fluide due aux effets hydrauliques | [m.s$^{-1}$] |
| $V_{pore}$ | Vitesse moyenne du fluide au sein des pores canaliculaires | [m.s$^{-1}$] |
| $V_s$ | Volume du domaine solide | [m$^3$] |

# Abréviations

| | |
|---|---|
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| BMP | Bone Morphogenic Protein : facteur de croissance osseuse |
| $\beta$ TCP | Phosphate Tricalcique $\beta$ : céramique biocompatible |
| CRRET | Laboratoire Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires (Université Paris-Est Créteil) |
| CSM | Cellule Souche Mésenchymateuse |
| CT | Cylindres Tortueux : cas particulier de la loi de Kozeny-Carmann |

| | |
|---|---|
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid |
| FP | Faible Porosité : cas particulier de la loi de Kozeny-Carmann |
| HAP | Hydroxyapatite : céramique biocompatible |
| hCSM | Cellule Souche Mésenchymateuse humaine |
| MC3T3 | Précurseurs ostéoblastiques de souris immortalisés |
| MEC | Matrice Extracellulaire |
| MEF | Méthode des éléments finis |
| MG63 | Cellules osseuses cancéreuses humaines |
| NIH-3T3 | Lignée de fibroblastes immortels embryonnaires de souris |
| PBS | Phosphate Buffer Saline : solution tampon |
| PCL | Polycaprolactone : polymère |
| PET | Polyethylene terephthalate : polymère biocompatible |
| PDGF | Platelet-Derived Growth Factor : facteur de croissance |
| PDLA | Poly-DL-lactic acid : polymère biocompatible |
| PGA | Polyglycolic acid : polymère biocompatible |
| Pk | ($k \geq 0$) : k-ième changement de flasque des cellules lors de la phase d'amplification |
| PLA | Polylactic acid : polymère biocompatible |
| PLLA | Poly-L-lactic acid : polymère biocompatible |
| PMMA | Polymethyl Methacrylate : polymère utilisé en histologie |
| PTN | Pleiotrophin : facteur de croissance |
| SS | Sphères Solides : cas particulier de la loi de Kozeny-Carmann |
| SVF | Sérum de veau fœtal |
| TGF$\beta$ | Transforming Growth Factor $\beta$ : facteur de croissance |
| T-W | (modèle) : relatif à l'étude de Tsay and Weinbaum [253] |
| VEGF | Vacsular Endothelial Growth Factor : facteur de croissance angiogénique |
| W | (données ou modèle) : relatif à l'étude de Weinbaum et al. [265] |
| Y | (données) : données anatomiques issues de l'étude de You et al. [280] |

# Introduction

Les lésions osseuses de grande taille font actuellement partie des pathologies qui ne bénéficient pas de stratégie thérapeutique satisfaisante. En effet, les traitements (généralement chirurgicaux) actuellement disponibles sont longs, contraignants, et possèdent un risque élevé de complications associées. De plus, ils ne permettent pas toujours d'obtenir la guérison complète de l'os touché, ce qui se traduit par des séquelles plus ou moins invalidantes pour les patients concernés. Face à la nécessité de mettre au point de nouvelles méthodes de prise en charge de ce type de fractures, de nombreuses études ont été réalisées ces dernières années, pour développer des protocoles de soins plus performants et moins invasifs.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux de ces nouvelles stratégies de réparation osseuse : la mise au point d'implants issus de l'ingénierie tissulaire, couplant biomatériaux et cellules souches, et le chemisage de la lésion par le périoste environnant. Ces protocoles, bien que très différents, reposent tous les deux sur des phénomènes de transport de cellules, de fluide et d'ions au sein de milieux poreux complexes. L'objectif de l'étude présentée dans ce document est donc d'identifier le rôle joué par les mécanismes de transport dans la mise au point de ces deux stratégies de réparation osseuse, afin de proposer une explication aux comportements parfois paradoxaux observés *in situ* ou *in vitro*.

Pour cela, nous avons choisi de coupler les études expérimentales réalisées à des simulations numériques. Ces dernières, sans chercher à reproduire fidèlement le système réel étudié, permettent une meilleure compréhension du rôle des différents phénomènes mis en jeu lors de la réalisation des essais expérimentaux, souvent difficiles à isoler expérimentalement. Elles permettent ainsi de guider le développement futur des protocoles mis en place.

Après un premier chapitre présentant le contexte clinique et scientifique dans lequel s'inscrit cette étude, le deuxième chapitre de ce document est consacré à la détermination d'une loi

permettant de relier la perméabilité d'un milieu poreux, paramètre déterminant dans l'étude des phénomènes de transport en son sein, aux caractéristiques géométriques de ses pores. D'un point de vue plus général, ce chapitre permet de mettre en évidence l'existence de différents phénomènes physico-chimiques concurrents lors de la traversée du tissu osseux par une solution ionique telle que les fluides biologiques, et de dégager des outils de modélisation qui serviront à l'analyse des études expérimentales.

Le chapitre 3 est lui dédié à la mise en place d'un protocole d'ensemencement cellulaire *in vitro*, réalisé sur des substituts osseux céramiques commercialisés. Il s'agit ici de déterminer l'aptitude de ces biomatériaux de comblement à être le siège d'un développement tissulaire contrôlé dans le cadre de la mise au point d'implants issus de l'ingénierie tissulaire, associant support minéral, cellules souches et facteurs chimiques. Les résultats obtenus lors de ces essais, qui semblent indiquer que la structure de ces substrats constitue un facteur limitant dans le développement de tels implants, ont motivé la mise en place d'un modèle numérique présenté au chapitre 4.

Ce dernier prend en compte l'évolution des sollicitations mécaniques, de la densité cellulaire, et des taux de glucose et d'oxygène pore par pore au cours de temps. Il permet ainsi d'identifier des facteurs géométriques clés de la structure poreuse, qui jouent un rôle déterminant dans l'obtention d'un ensemencement puis d'une prolifération cellulaires homogènes lors des premiers stades de développement des implants. Cette étude constitue une première étape dans la réalisation d'un cahier des charges pour la mise au point de supports poreux favorisant un développement tissulaire homogène et contrôlé en leur sein. Elle pourra être complétée par la réalisation de tests complémentaires, et un enrichissement du modèle pour prendre en compte d'autres phénomènes physico-chimiques intervenant lors de la culture de tels implants, mais non considérés dans cette première approche.

Enfin, le cinquième chapitre est consacré à une étude expérimentale des propriétés de transport du périoste, réalisée dans le cadre d'une mission de trois mois au sein de l'équipe du professeur Melissa L. Knothe Tate (Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA). Les résultats obtenus sont ensuite analysés à la lumière des outils dégagés dans le chapitre 2, pour proposer un ensemble d'hypothèses explicatives concernant le comportement parfois étonnant de cette membrane, et orienter les études expérimentales complémentaires à venir.

# Chapitre 1

# Fractures critiques et réparation osseuse

Composé d'environ $200$ os et représentant $15\%$ du poids du corps, le squelette humain constitue un système complexe en constant renouvellement. Sous sa forme actuelle, il est en effet le résultat des modifications successives issues de l'évolution des espèces animales (sortie du milieu marin, évolution de la taille des organismes), et le support des aptitudes physiques propres à notre espèce (bipédie, pouce opposable). Cette adaptation se retrouve également à l'échelle de la vie d'un individu, au cours de laquelle le squelette se modifie légèrement en fonction des caractéristiques physiques propres à chacun (pratique sportive plus ou moins intense, âge, sexe, blessures antérieures,...) grâce au mécanisme de remodelage osseux (voir paragraphe 1.2.1). Il est ainsi entièrement renouvelé tous les 10 à 12 ans [263].

Au sein de l'organisme, le squelette remplit trois fonctions [197, 171]. La première est mécanique : c'est la structure qui soutient le corps et protège les organes. Il est également à l'origine de la locomotion, et est le support de la bipédie. La deuxième est métabolique : comme pour l'ensemble des espèces animales terrestres, il constitue la principale réserve de calcium et de phosphate. Il est ainsi, avec le foie et les reins, l'un des acteurs principaux de leur régulation au sein de l'organisme. Enfin, en abritant la moelle osseuse rouge, il possède un rôle hématopoïétique, car cette dernière est le siège de la formation des différentes lignées de cellules sanguines [240].

Toute mise à mal de ce système, qu'elle soit progressive (ostéoporose, arthrose) ou brutale (traumatisme), peut donc se révéler rapidement invalidante, et ouvre la voie à de nombreuses complications affectant d'autres systèmes du corps humain. En touchant à la mobilité et au maintien de la station debout, elle entraîne une baisse de masse musculaire au niveau du membre concerné,

ce qui peut être lourd de conséquences chez les sujets âgés ou déjà affaiblis (fracture du col du fémur en particulier). Si le tissu osseux possède une capacité de régénération et de cicatrisation, il existe un seuil d'étendue et de complexité des lésions au-delà duquel une aide extérieure doit être apportée pour maintenir l'intégrité du tissu.

Dans le cadre de ce travail, nous nous concentrerons sur les fractures, laissant de côté les autres dégradations possibles du système ostéo-articulaire. En effet, si les fractures simples peuvent être soignées à l'aide de méthodes classiques d'immobilisation (plâtre, vis, broches, etc.), nous verrons qu'il n'existe à l'heure actuelle pas de traitement satisfaisant pour les lésions plus complexes ou étendues (fractures de grande taille). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées à ce type de situations, ce qui passe tout d'abord par une meilleure connaissance du tissu osseux et de son fonctionnement.

La première partie de ce chapitre est donc consacrée à la structure des os et des tissus qui les composent. Nous aborderons ensuite les différents mécanismes de réparation osseuse, avant de nous intéresser aux fractures de grande taille et aux stratégies thérapeutiques, actuelles ou en développement, qui leur sont adressées.

## 1.1 Les os et leur structure

Notre squelette est composé d'os de morphologie et d'origine embryonnaire différentes. On distingue ainsi, du point de vue de l'anatomie générale, trois principales catégories d'os :

- *les os courts* possèdent des dimensions similaires dans les trois directions de l'espace. Il s'agit par exemple des vertèbres, des os de la main (carpe) et de ceux du pied (tarse).
- *les os plats* possèdent une dimension nettement inférieure aux deux autres. Parmi eux, on retrouve le sternum, l'os pariétal (partie du crâne) ou la scapula (omoplate).
- *les os longs* possèdent une dimension nettement supérieure aux deux autres. Il s'agit par exemple des os des membres (fémur, tibia, humérus, etc). C'est ce type d'os qui sera plus particulièrement visé par cette étude, même si les techniques abordées ne leur sont pas spécifiques. Le long de leur direction principale, leur partie centrale, quasi-cylindrique, est appelée diaphyse, alors que leurs extrémités, recouvertes de cartilage articulaire, sont les épiphyses. Les zones situées entre la diaphyse et les épiphyses sont elles appelées métaphyses.

A ces trois catégories principales viennent s'ajouter les os pneumatiques (sinus) et les os sésamoïdes (patella ou rotule) [197]. Ces différentes morphologies sont associées à des différences de structure du tissu osseux, issues de l'adaptation progressive des os à leur environnement mécanique.

### 1.1.1 Différents types d'os

La matrice solide du tissu osseux est composée à $70\%$ de minéraux (cristaux d'apatite), et contient $10\%$ d'eau et $20\%$ de matière organique (principalement du collagène de type I) [79]. En fonction de sa structure, on distingue deux types de tissu osseux : l'os cortical, qui forme une fine couche à la surface des os plats et courts, et est présent sur la diaphyse des os longs ; et l'os trabéculaire ou spongieux, présent dans les épiphyses des os longs et constituant la majeure partie des os plats et courts. Ces deux tissus possèdent des propriétés mécaniques très différentes, et jouent des rôles bien distincts au sein du système ostéo-articulaire.

**Le tissu osseux cortical** Le tissu osseux cortical se situe à la périphérie de la diaphyse des os longs. Il représente $80\%$ de la masse osseuse totale, et confère au squelette ses propriétés mécaniques [79, 226]. Sa porosité est inférieure à $5\%$ [49], et il présente une architecture multi-échelle. En effet, pour optimiser l'apport de nutriments au sein du tissu, les fibres de collagène et les cristaux d'apatite sont organisés en lamelles concentriques d'épaisseur $3-7$ $\mu$m, autour des vaisseaux sanguins parallèles à la direction principale de l'os considéré. Ils sont ainsi organisés en *ostéons*, cylindres de longueur de l'ordre du millimètre et de $200-250$ $\mu$m de diamètre [129, 49] formés autour de canaux, appelés canaux de Havers, contenant ces vaisseaux sanguins. Ces derniers sont reliés entre eux par des canaux transverses, appelés canaux de Volkmann [49, 226].

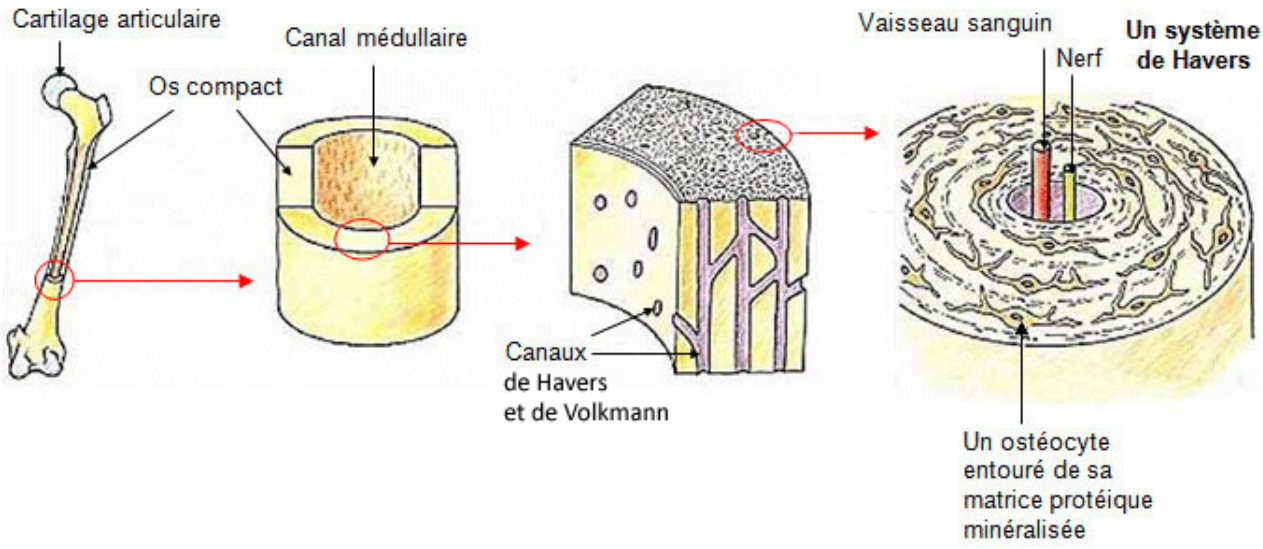



FIGURE 1.1 – Structure du tissu osseux cortical (ou compact). Image adaptée de *http ://www.medicalorama.com*, saisie le 10 septembre 2013.

Environ un tiers de ces lamelles contiennent des cellules osseuses mécano-sensibles, les ostéocytes, logées dans des lacunes, cavités de l'ordre de $1 - 10$ $\mu$m remplies de fluide et de matrice organique [129, 202]. Ces cellules sont reliées par des dendrites, qui traversent le tissu au cœur de canalicules, dont le diamètre est de l'ordre de $100$ nm [130, 15]. Chaque ostéocyte possède ainsi quelques dizaines de dendrites, ce nombre pouvant varier avec l'âge du sujet [15]. L'ensemble lacunes/canalicules constitue un réseau poreux, appelé réseau lacuno-caniculaire, qui a une triple fonction au sein du tissu osseux : acheminer les nutriments, évacuer les déchets issus de l'activité cellulaire, mais aussi transmettre les signaux biochimiques et les sollicitations mécaniques qui font partie intégrante de la régulation de l'activité cellulaire [98]. Or, il a été montré que le maintien de ces fonctions ne pouvait plus être assuré au-delà d'un rayon de $200 - 250$ $\mu$m autour du canal principal de l'ostéon, les phénomènes de diffusion devenant alors insuffisants pour assurer un environnement physico-chimique stable. Il pourrait s'agir de la raison pour laquelle cette distance correspond au rayon moyen des ostéons [252].

**Le tissu osseux trabéculaire** Le tissu osseux trabéculaire se trouve principalement dans l'épiphyse des os longs et dans les os courts et plats [197, 171]. Il est beaucoup plus poreux que l'os

cortical, avec une porosité d'environ $85\%$ [79, 49]. Les fibres de collagène et les cristaux d'apatite qui le composent sont organisés en lamelles parallèles les unes aux autres, qui forment des travées osseuses, les trabécules, orientées dans la direction des contraintes principales subies par l'os considéré. Elles renforcent ainsi la structure périphérique corticale.

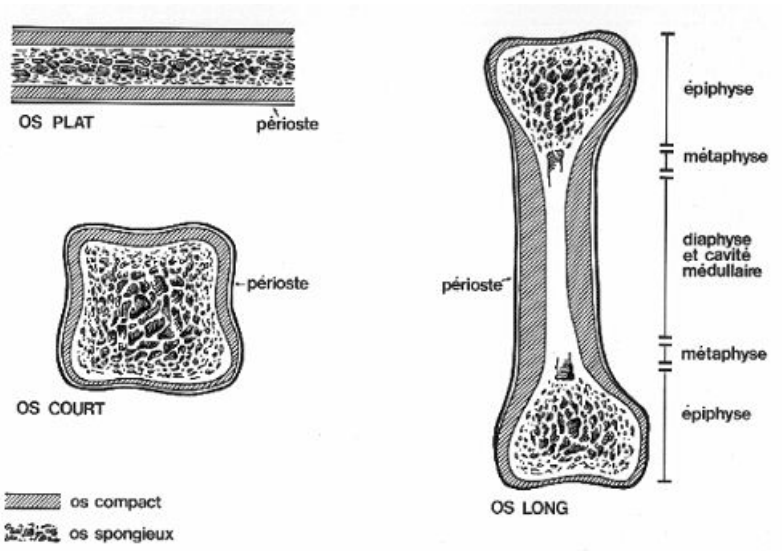



FIGURE 1.2 – Zones de présence du tissu osseux trabéculaire ou spongieux. Source de l'image : *http ://www.isto.ucl.ac.be/safe/tconj2.html*, saisie le 10 septembre 2013.

Au cœur de ces travées se trouvent les deux types de moelle osseuse. La moelle jaune, ou stroma, située aux extrémités des os longs, abrite des cellules souches mésenchymateuses, précurseurs de la majorité des cellules constituant les tissus du système musculo-squelettique (voir paragraphe 1.1.2) . La moelle rouge est elle située au cœur de la diaphyse des os longs. Elle abrite les précurseurs ostéoclastiques (voir paragraphe 1.1.2) et est le siège de l'hématopoïèse, *i.e.* la formation des différentes lignées de cellules sanguines (érythrocytes (globules rouges), leucocytes (globules blancs), thrombocytes (plaquettes)).

### 1.1.2 Les cellules mises en jeu

Le tissu osseux est donc un milieu complexe, qui renferme de nombreux types cellulaires. La suite de ce paragraphe en présente les quatre principaux.

**Cellules souches mésenchymateuses** Les cellules souches mésenchymateuses proviennent du développement embryonnaire du mésoderme, couche embryonnaire qui donne naissance aux tissus de l'appareil locomoteur (os, cartilage, muscle, tendon, moelle osseuse jaune) et aux tissus graisseux (adypocytes) [26]. Chez l'adulte, on les retrouve principalement dans la moelle osseuse jaune (cellules stromales mésenchymateuses) et le périoste, mais des cellules aux propriétés similaires ont également été observées dans d'autres tissus tels que le tissu adipeux [195], le cerveau, le foie, le pancréas ou les poumons [54].

Ces cellules pluripotentes possèdent une grande capacité de prolifération et peuvent se différencier en cellules osseuses (ostéoblastes, ostéocytes), cartilagineuses (chondroblastes, chondrocytes), musculaires (myoblastes, myocytes) ou graisseuses (adipocytes). Il a cependant été montré qu'il était possible *in vitro* de les orienter vers des cellules nerveuses ou hépatiques [16]. Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse jaune (cellules stromales), obtenues à partir de prélèvement de moelle osseuse humaine adulte. L'utilisation de ce type de cellules présente deux avantages par rapport aux cellules souches embryonnaires : le risque tumoral qui leur est associé est plus faible, et le prélèvement de moelle osseuse adulte, après consentement éclairé du patient, ne soulève pas de problème éthique.

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) représentent une fraction très faible de la population cellulaire présente dans la moelle osseuse adulte (1 CSM pour $10^4$ à $10^5$ cellules mononucléées prélevées). De plus, elles ne possèdent pas de marqueurs de surface caractéristiques, qui permettraient de les identifier au sein de la solution cellulaire. En revanche, elle possèdent, contrairement aux autres types cellulaires, une grande capacité à adhérer au plastique, ce qui permet de les isoler des autres types cellulaires, et notamment des cellules souches hématopoïétiques. Dans des conditions de culture appropriées, chacune de ces cellules donne ensuite naissance à une colonie de CSM à l'apparence fibroblastique. La cellule à l'origine de chaque colonie est appelée *Colony Forming Unit - Fibroblast* [40].

Comme nous le verrons au paragraphe 1.2, ces cellules jouent un rôle majeur dans le remodelage et la cicatrisation osseuse, et représentent donc un élément central des stratégies d'ingénierie tissulaire ostéo-articulaire.

**Ostéoblastes** Les ostéoblastes représentent environ $5\%$ des cellules osseuses [20], et sont issus de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) sous l'action de facteurs biochimiques divers (facteurs de transcription, de croissance, hormones) [65, 160]. Ce sont les cellules chargées de la formation du tissu osseux. Elles construisent ainsi la structure de collagène des lamelles, et sécrètent les protéines responsables de leur minéralisation. [160, 252]. Elles jouent également un rôle dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes [65, 70].

La différenciation de CSM en ostéoblastes se fait donc quand un besoin de construction de tissu se fait ressentir. Au cours de cette construction, certains ostéoblastes matures se trouvent emprisonnés dans la matrice osseuse, et se transforment en ostéocytes [47, 252]. D'autres, à la fin de la construction, viennent tapisser la surface du tissu nouvellement formé, au sein des canaux de Havers : ce sont les cellules bordantes qui, bien qu'elles apparaissent comme des ostéoblastes passifs, pourraient participer de façon importante au mécanisme de remodelage osseux [70, 28]. Ces cellules, tout comme les ostéocytes, sont reliées les unes aux autres par des jonctions communicantes.

**Ostéocytes** Les ostéocytes représentent la plus grande fraction des cellules osseuses, et sont également celles qui possèdent l'espérance de vie la plus longue (une dizaine d'années, contre quelques semaines pour les ostéoblastes par exemple) [20]. Ils appartiennent à la même lignée cellulaire que les ostéoblastes, et sont répartis uniformément dans l'ensemble de la matrice osseuse corticale, au sein du réseau lacuno-canaliculaire. Chaque ostéocyte est ainsi relié à une douzaine de voisins *via* ses dendrites (déployées au cœur des canalicules) et des jonctions communicantes [202, 50].

Cet ensemble cellulaire constitue un réseau capable de transmettre rapidement un signal à l'ensemble du tissu osseux, pour répondre à tout changement morphologique de sa matrice. Les ostéocytes sont en effet les "cellules mécano-sensibles" de l'os cortical : elles sont particulièrement sensibles aux contraintes induites par toute modification de l'écoulement du fluide interstitiel qui les entoure (cisaillement, déformation membranaire), et transforment ce signal mécanique en un signal biochimique transmis, notamment, par le biais des jonctions communicantes qui les relient : c'est le phénomène de mécano-transduction osseuse [50, 20]. Ce mécanisme, bien qu'encore mal connu, fait des ostéocytes un acteur majeur dans les phénomènes de remodelage osseux et dans la

régulation homéostatique des minéraux au sein de l'organisme [98, 52].

**Ostéoclastes** Contrairement aux deux types cellulaires précédents, les ostéoclastes ne sont pas issus des CSM, mais des cellules souches hématopoïétiques abritées par la moelle osseuse rouge. Il s'agit en fait de macrophages, qui sont des cellules géantes polynucléées participant à la réponse immunitaire de l'organisme [252, 28]. Ils ont donc une durée de vie relativement courte (quelques jours) et représentent à peine $1\%$ des cellules osseuses [19]. Ce sont les cellules responsables de la résorption de la matrice osseuse lors du processus de remodelage (voir paragraphe 1.2.1). Leur activation requiert la présence de plusieurs facteurs biochimiques et est en partie contrôlée par l'activité ostéoblastique : un déséquilibre entre les activités respectives de ces deux types cellulaires peut être à l'origine de plusieurs maladies du système ostéo-articulaire telles que l'ostéoporose ou la polyarthrite rhumatoïde [23].

### 1.1.3 Le périoste

Le périoste est une membrane fibreuse qui recouvre la majeure partie des os longs, à l'exception des surfaces articulaires et des zones d'insertion des tendons et des muscles. Il est en particulier présent dans les zones à fort risque de fracture, telles que le col du fémur (bien que l'existence de périoste dans cette zone ait été questionnée par le passé), la partie distale du radius et les vertèbres [6].

Le périoste est composé de deux couches distinctes (voir figure 1.3). La couche extérieure ou couche fibreuse, du côté du muscle, est principalement composée de collagène, de fibres d'élastine et de fibroblastes, et possède son propre réseau sanguin (microvaisseaux) et nerveux. La couche interne ou couche cellulaire, du côté de l'os, contient des cellules souches mésenchymateuses, des progéniteurs ostéoblastiques, des fibroblastes, et un réseau dense de microvaisseaux sanguins et de nerfs sympathiques. Grâce à cette forte vascularité, le périoste est à l'origine d'environ un tiers des apports sanguins de l'os qu'il entoure, et constitue une réserve importante de cellules souches mobiles. Il régule également les échanges de ce dernier avec son milieu extérieur, en possédant un perméabilité directionnelle. Il joue ainsi le rôle de barrière protectrice du système osseux [6, 252].

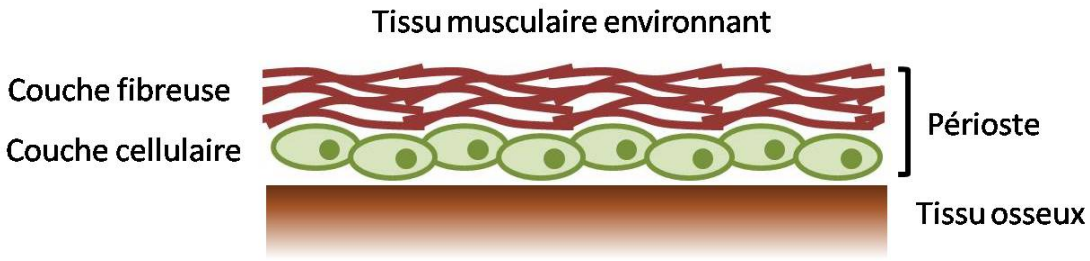



FIGURE 1.3 – Représentation schématique de la structure du périoste

De plus, il est l'origine du mécanisme d'ossification périostale, qui consiste en l'apposition de lamelles osseuses à la périphérie de l'os cortical, pour constituer le cortex périostal. Ce dernier, en épaississant la couche de tissu cortical, augmente la résistance mécanique de l'os considéré. Il a ainsi été constaté que cette capacité d'ossification était beaucoup plus prononcée dans les zones à fort risque de fracture (col du fémur ou radius par exemple) [6, 47, 206].

Mais, s'il a été observé que les cellules du périoste sont beaucoup plus sensibles aux sollicitations mécaniques extérieures que celles situées à l'intérieur du tissu osseux [134, 181], les mécanismes à l'origine du fonctionnement particulier de cette membrane sont encore méconnus. En raison de son rôle capital, notamment dans la cicatrisation des fractures [6, 134], de nombreuses études visent actuellement à identifier les phénomènes physico-chimiques à l'origine de ces propriétés particulières. Nous y reviendrons plus en détail au paragraphe 1.5 et dans le dernier chapitre de ce document.

## 1.2 Les différents mécanismes de réparation osseuse

Grâce à sa structure particulière et aux différents types cellulaires qu'il contient, le tissu osseux est en constant remaniement, ce qui lui permet de maintenir ses propriétés mécaniques, en réparant par exemple les microfissures de fatigue qui peuvent apparaître au fil du temps. Ce mécanisme de renouvellement est appelé *remodelage osseux*, et résulte de l'équilibre entre l'activité de plusieurs lignées cellulaires. En revanche, lorsqu'une lésion plus importante apparaît, ce mécanisme n'est plus suffisant pour maintenir l'intégrité du système ostéo-articulaire. La réparation de l'os blessé est alors assurée par le processus de *cicatrisation osseuse*, qui implique le système immunitaire en plus des cellules du système osseux.

Ces deux mécanismes jouent un rôle primordial dans la prévention et la consolidation des fractures. C'est pourquoi ce paragraphe leur est consacré.

### 1.2.1 Le remodelage osseux

Le tissu osseux est remanié en permanence par les ostéoblastes et les ostéoclastes pour s'adapter aux contraintes extérieures qu'il subit, réparer les microfissures de fatigue et réguler le taux de calcium et de phosphate au sein de l'organisme. Ce processus de remodelage osseux, garant de l'intégrité et de la solidité mécanique du squelette, est le résultat de plusieurs mécanismes cellulaires successifs, qui peuvent être divisés en six étapes, présentées sur la figure 1.4.

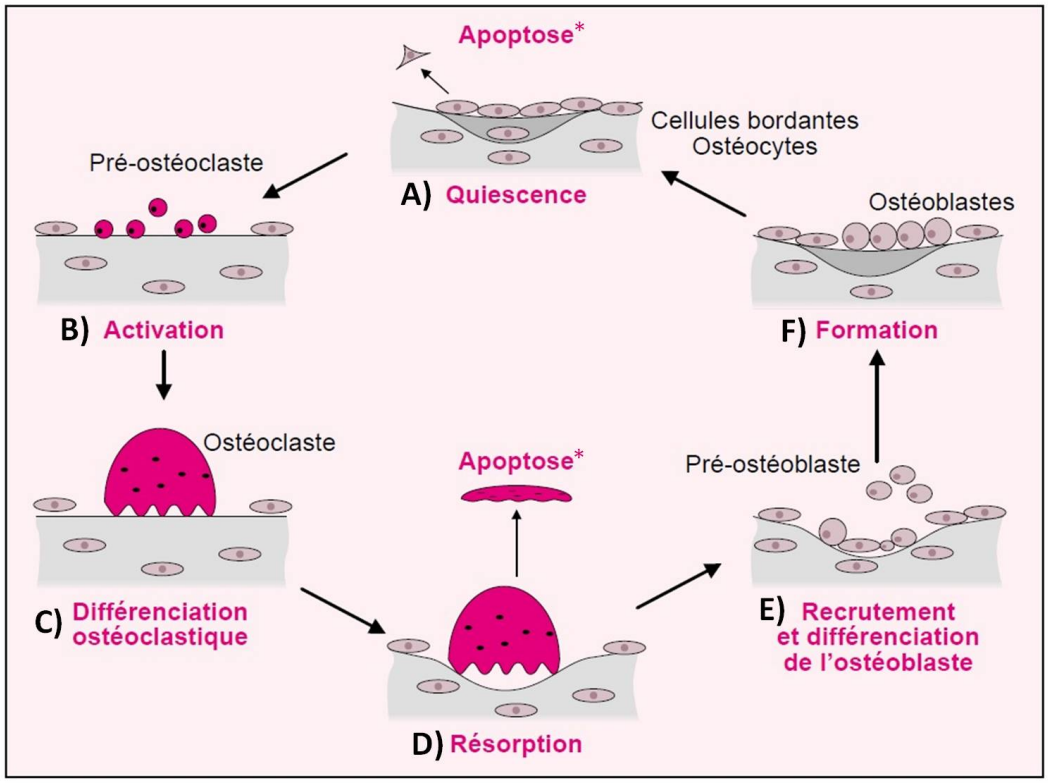



FIGURE 1.4 – Représentation schématique du processus de remodelage osseux. Image d'après Marie [168]. *apoptose : mécanisme de mort cellulaire.

**La quiescence** Il s'agit de l'état "normal" du tissu osseux (figure 1.4.A), en dehors des périodes de remodelage. Les ostéocytes présents au sein de la matrice produisent des facteurs biochimiques qui inhibent l'action des ostéoclastes, empêchant ainsi toute destruction du tissu osseux dans la zone concernée [98, 19].

**L'activation ostéoclastique** En cas de changement local de la morphologie de la matrice osseuse (fissure, microfracture), les ostéocytes situés à proximité immédiate du site de lésion meurent (phénomène d'apoptose). L'inhibition de l'activité ostéoclastique disparaît donc localement, ce qui entraîne le recrutement de progéniteurs ostéoclastiques (issus des cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle rouge, figure 1.4.B), puis leur différenciation en ostéoclastes (figure 1.4.C) [20, 98, 168].

**La résorption osseuse** Ces ostéoclastes se fixent alors à la surface osseuse pour former une cavité fermée entre celle-ci et leur corps cellulaire, dans laquelle ils sécrètent plusieurs enzymes et acides qui dissolvent localement la matrice osseuse (figure 1.4.D). Les déchets formés au cours de ce processus sont évacués dans le sang [23]. Au fur et à mesure de l'avancée de la résorption osseuse, les ostéoclastes modifient leur squelette cellulaire pour progresser le long de la zone à traiter, formant ainsi une cavité appelée lacune de Howship [79]. Leur activité s'arrête lorsqu'ils arrivent au contact d'une zone saine, en raison de la présence des inhibiteurs ostéocytaires. Ils disparaissent alors par apoptose [23, 168]. Ce processus de résorption peut durer entre 2 et 3 semaines [102].

**Le recrutement ostéoblastique** Les cellules bordantes présentes au voisinage de la cavité de résorption affluent pour préparer la future synthèse osseuse (figure 1.4.E), en déposant au fond de la lacune une couche de protéines spécifiques [70]. Parallèlement, des cellules progénitrices des ostéoblastes (cellules souches mésenchymateuses) migrent vers la zone de lésion, puis se différencient en ostéoblastes fonctionnels [168].

**La formation osseuse** Ces ostéoblastes synthétisent une nouvelle matrice osseuse, en déposant des fibres de collagène pour remplir progressivement la cavité (figure 1.4.F). Au cours de ce processus, entre $10\%$ et $20\%$ d'entre eux se laissent emprisonner dans la matrice en construction, pour former les nouveaux ostéocytes [201, 256]. Le collagène nouvellement déposé est ensuite progressivement minéralisé pour former le nouveau tissu osseux.

En fin de remodelage osseux, les ostéoblastes restants se différencient en cellules bordantes pour recouvrir la nouvelle surface osseuse, ou disparaissent par apoptose. Le tissu osseux retourne alors à son état de quiescence [168]. La formation de ce nouveau tissu dure entre $3$ et $4$ mois [102].

Remarque : Ce processus correspond au remodelage osseux ciblé, qui permet de maintenir l'intégrité mécanique du tissu. Il existe un autre type de remodelage, non ciblé, qui permet de stocker ou de libérer du calcium et/ou du phosphate, pour maintenir leur concentration au sein de l'organisme à un niveau satisfaisant. Dans ce cas, la matrice osseuse est résorbée (ou formée) dans des zones aléatoires du squelette, pour ne pas fragiliser une région précise de ce dernier.

### 1.2.2 La cicatrisation osseuse

Si le remodelage osseux permet de réparer des microlésions au sein du tissu osseux, les traumatismes plus importants sont pris en charge au moyen d'un autre mécanisme : la cicatrisation osseuse. Ce processus, qui ressemble par certains aspects aux mécanismes de croissance, nécessite l'intervention de plusieurs types cellulaires et la présence de nombreux facteurs biochimiques. Dans la plupart des cas de fractures, on observe une cicatrisation indirecte [170] : l'os est reconstruit à partir d'une structure cartilagineuse, à l'aide d'un mécanisme similaire à celui de la croissance des os longs [47]. Cette forme de cicatrisation est généralement modélisée par quatre étapes successives, présentées sur la figure 1.5.

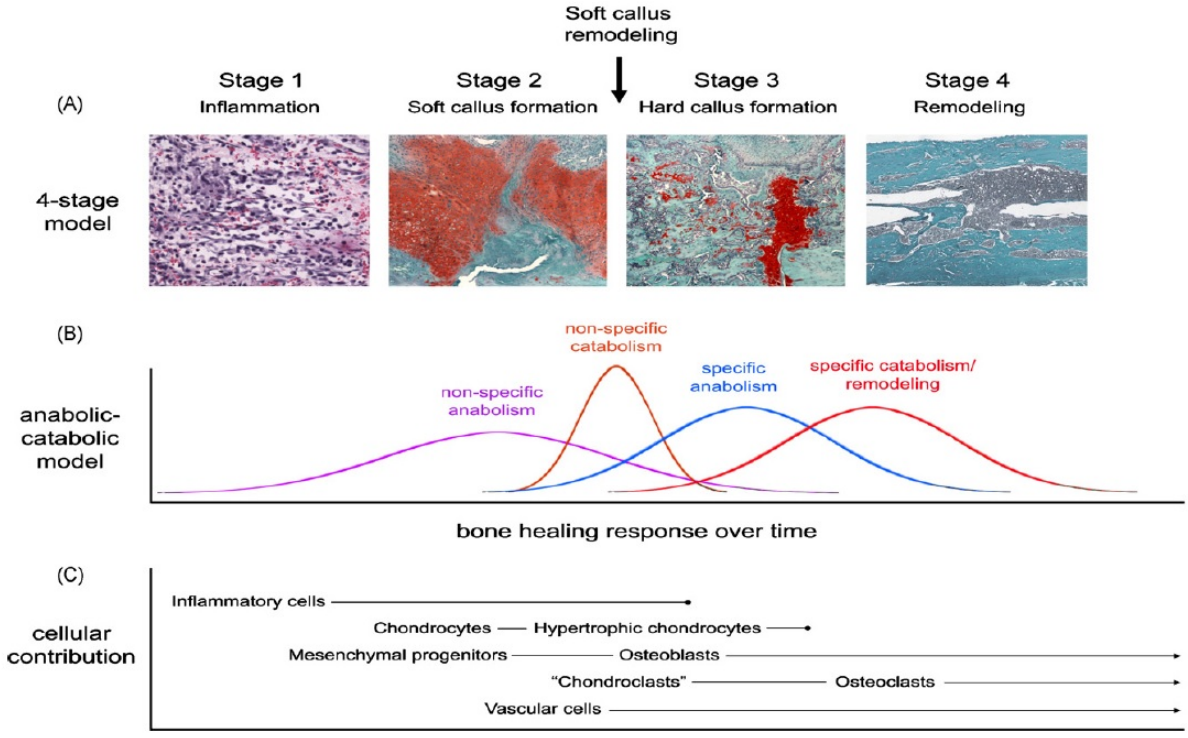



FIGURE 1.5 – Représentation schématique du processus de cicatrisation osseuse. Image issue de Schindeler et al. [234].

**Inflammation** Le traumatisme à l'origine d'une fracture osseuse entraîne également la rupture de vaisseaux sanguins et des tissus mous attenant à la zone de lésion. La moelle osseuse est elle aussi localement endommagée. En réponse à ces agressions, on assiste à une réaction inflammatoire aiguë, étape commune à la cicatrisation de tous types de plaies [170, 234] (figure 1.5.A, stage 1). Le sang libéré par la rupture des vaisseaux sanguins locaux remplit le site de la lésion et ses alentours, pour former un hématome contenu par les tissus mous sains voisins. Diverses cellules immunitaires affluent au sein de ce dernier (lymphocytes, macrophages, monocytes) [108], aux côtés de cellules endothéliales et de la moelle osseuse.

Ces cellules produisent de nombreux facteurs biochimiques responsables de la coagulation de l'hématome, puis de sa transformation en un tissu fibreux appelé *thrombus* autour de la lésion, grâce à l'intervention de fibroblastes. Elles produisent également des facteurs angiogéniques (qui favorisent la construction de vaisseaux sanguins). C'est également à ce stade que s'effectue un recrutement important de cellules souches mésenchymateuses (figure 1.5.C), bien que leur origine dans l'organisme soit encore mal connue [174] : s'il est généralement admis que les tissus voisins représentent un lieu de provenance important de ces cellules, un processus de recrutement systémique, *via* la circulation sanguine, n'est pas exclu [170, 17].

**Formation d'un callus mou (cartilagineux)** Sous l'action des facteurs biochimiques secrétés par les cellules inflammatoires, les cellules souches mésenchymateuses présentes sur le site de la lésion se différencient en chondroblastes et transforment progressivement, en joignant leur action à celle des fibroblastes et des macrophages déjà présents [108], le thrombus fibreux en tissu cartilagineux (figure 1.5.A, stage 2). Cela confère à la lésion une plus grande stabilité mécanique. Ce tissu servira également de socle de base pour la formation ultérieure du tissu osseux (ossification endochondrale et membranaire) [234]. Ce bloc cartilagineux, appelé *callus mou*, est peu vascularisé. A la fin de sa formation, les chondrocytes responsables de sa construction s'hypertrophient et la matrice cartilagineuse se calcifie. Des cellules vasculaires endothéliales sont ensuite recrutées pour préparer la revascularisation de la lésion (figure 1.5.C) [170, 17].

**Formation d'un callus dur (osseux)** Cette troisième étape correspond à la phase d'ostéogénèse la plus active du processus [234]. Sous l'action des différents facteurs biochimiques présents [212],

les cellules souches mésenchymateuses recrutées sur le site de la lésion se différencient en ostéoblastes (figure 1.5.C) qui, avec les ostéoclastes issus de la niche hématopoïétique, remplacent le callus mou minéralisé par un tissu osseux immature, à la résistance mécanique plus importante (figure 1.5.A, stage 3). Ce procédé s'effectue à la fois de la périphérie vers le cœur de la lésion (ossification membranaire) et de sa section médiale vers ses extrémités proximale et distale (amont et aval, ossification endochondrale), en parallèle de la revascularisation progressive de la zone de fracture [234, 170, 212]. Il se forme ainsi un bloc osseux appelé *callus dur*.

**Remodelage osseux** Enfin, le tissu osseux immature est progressivement remodelé pour conférer à l'os nouveau sa structure finale (corticale ou trabéculaire), et donc ses propriétés mécaniques originelles (figure 1.5.A, stage 4). Ce renouvellement se fait selon le mécanisme décrit au paragraphe 1.2.1. La réparation d'une fracture simple dure ainsi environ 6 semaines [108].

Bien que présentées séquentiellement, ces quatre étapes se chevauchent dans le temps *in vivo* [212]. Le remodelage osseux, par exemple, commence à la périphérie du callus dur alors que le callus mou du centre de la lésion n'a pas encore été résorbé. Ce processus de cicatrisation indirecte peut donc être vu comme une somme d'actions d'anabolisme (construction) et de catabolisme (destruction) tissulaires (figure 1.5.B) [234]. L'équilibre entre ces différents mécanismes est alors essentiel à la réussite de la réparation de la zone lésée. De plus, la stabilité mécanique de la zone de lésion est essentielle pendant le processus de cicatrisation [89]. Un mauvais maintien de la zone concernée augmente en effet grandement les risques d'absence de consolidation (voir paragraphe 1.3). On peut par ailleurs remarquer le rôle primordial joué par les cellules souches mésenchymateuses tout au long de ce processus [17, 174], puisque'elles sont les progéniteurs de la majorité des types cellulaires impliqués.

Remarque : Il existe un autre mécanisme de cicatrisation, plus rare, appelé cicatrisation directe. Elle intervient dans le cas où la distance entre les deux extrémités de la fracture est très faible ($\leq 1$ mm), et où la zone de lésion est fermement maintenue mécaniquement. Il s'agit typiquement de fractures réduites chirurgicalement et fixées à l'aide de broches ou de vis. Dans ce cas, le tissu osseux est reconstruit directement sur la zone de fracture, sans passer par la phase cartilagineuse. On

distingue alors la cicatrisation de contact, qui intervient lorsque cette distance est inférieure à $0.01$ mm et dans laquelle le tissu osseux structuré est directement reconstruit sur le site de fracture, et la cicatrisation "gap". Dans ce dernier mécanisme, on assiste dans un premier temps à la formation d'un os lamellaire, dont les lamelles sont orientées perpendiculairement à la direction principale de l'os. Ce tissu, à la résistance mécanique relativement faible, est ensuite remodelé pour conférer au nouvel os sa structure, et donc sa résistance, finales [170, 244].

## 1.3 Absence de consolidation et fractures critiques

Si, pour la plupart des fractures, la réduction (replacement des deux fragments osseux dans le bon alignement) et une immobilisation ferme suffisent à permettre à l'organisme de régénérer le tissu endommagé, certaines lésions, trop complexes ou mal prises en charge, ne cicatrisent pas correctement. Le processus de cicatrisation peut alors être ralenti – on parle dans ce cas de consolidation osseuse retardée – ou s'arrêter avant la guérison de la blessure. Il s'agit alors d'une *absence de consolidation* (ou de fracture non consolidée), qui concerne environ $5\%$ des fractures [21]. C'est à ce dernier cas que nous allons nous intéresser dans la suite de ce paragraphe.

### 1.3.1 L'absence de consolidation

L'absence de consolidation osseuse est définie par l'arrêt spontané du processus de cicatrisation avant que le tissu osseux n'ait été reconstruit au niveau de la lésion [46, 209, 2]. Ce diagnostic est effectué en comparant des radiographies successives de la lésion, en absence d'évolution positive de cette dernière au bout de 6 à 8 mois. Cela se traduit par une absence de tissu osseux reliant les deux extrémités de la fracture, un espace non comblé entre les deux segments osseux, et un callus hypertrophié ou réduit [209, 2]. Les conséquences d'une absence de consolidation sont multiples pour le patient : douleur persistante, mobilité et fonctionnalité du membre réduites, risques d'infection. Dans le cas d'une mauvaise stabilisation de la lésion, on peut également observer la formation d'un tissu cartilagineux articulaire avec production de liquide de synovie (pseudarthrose) [192, 21].

L'absence de consolidation d'une fracture peut avoir deux origines différentes, éventuellement coexistantes : une mauvaise stabilisation mécanique de la lésion ou un environnement biologique non satisfaisant. Dans le premier cas, le manque de stabilité entraîne des contraintes et des défor-

mations du tissu fibreux trop importantes pour permettre sa minéralisation. Dans le second cas, ce sont les facteurs cellulaires et biochimiques qui posent problème. Cela peut être lié à une mauvaise vascularisation, à une infection de la lésion, ou à une altération des tissus mous environnants (périoste en particulier) [209, 192]. C'est également le cas des fractures présentant une perte importante de volume osseux [235].

On distingue traditionnellement deux classes d'absence de consolidation osseuse, en fonction des caractéristiques du callus observé : les lésions hypertrophiques et les lésions atrophiques. Les premières présentent un callus fortement vascularisé et en forme de "patte d'éléphant" [209]. Elles sont généralement dues à une mauvaise stabilisation mécanique, qui génère de forte contraintes sur le callus et rend sa minéralisation impossible. Une fixation adéquate suffit alors dans la plupart des cas à relancer le mécanisme de cicatrisation [209, 192, 238]. Les secondes sont elles plus problématiques. Elles sont caractérisées par un callus réduit et constitué de tissu fibreux pas ou peu vascularisé. Elles possèdent donc une capacité de cicatrisation faible ou absente, et nécessitent une prise en charge plus importante pour rétablir la stabilité mécanique d'une part, et relancer l'activité biologique d'autre part. Pour cela, les tissus dévitalisés sont retirés chirurgicalement, et l'espace vacant est comblé par un support qui doit : permettre une affluence massive de cellules souches mésenchymateuses, servir de support à la future repousse osseuse (ostéoconduction), et permettre la production des facteurs biochimiques adéquats (ostéoinduction) [237, 238, 209, 244].

### 1.3.2 Les fractures critiques ou de grande taille

Au-delà d'un certain volume de perte osseuse, une fracture ne peut pas cicatriser spontanément et conduit systématiquement à une absence de consolidation. A partir de ce constat, Schmitz and Hollinger [235] ont défini la *taille critique de fracture* comme étant "la taille de lésion au-delà de laquelle toute fracture ne cicatrisera pas durant la durée de vie du sujet". Cette définition a ensuite été remaniée pour des questions de praticité clinique : on considère comme taille critique de fracture le seuil au-delà duquel la cicatrisation ne dépasse pas le stade fibreux un an après le traumatisme initial [109, 2]. Ce tissu fibreux est de plus peu vascularisé. Les fractures critiques, ou fractures de grande taille, sont donc un cas particulier des absences de consolidation atrophiques [237].

Ce type de blessure est observé après des traumatismes violents (chocs à haute énergie), ou dans le cas de fractures ouvertes et/ou fortement déplacées. Il peut aussi être causé par une résection de tumeur osseuse. De plus, la nécrose d'un volume important d'os peut être provoquée par des radiations ou des agents chimiques particuliers [237, 99, 34, 244].

Remarque : Bien que la définition de la taille critique des fractures porte sur la durée de vie, ou sur un an dans sa version modifiée, nous avons vu au paragraphe précédent que, pour des raisons de gêne du patient, le diagnostic d'absence de consolidation était le plus souvent effectué 6 à 8 mois après le traumatisme initial.

La taille critique de fracture varie en fonction de l'espèce animale, allant par exemple de 8 mm chez le rat à 20 mm chez le chien [2]. Sa valeur chez l'humain est plus délicate à déterminer que pour les espèces animales utilisées en laboratoire. Ainsi, elle est généralement estimée à 1 cm, même si certaines études montrent que cette valeur pourrait être sous-estimée [192, 21, 233]. Elle peut également varier avec l'os concerné, en fonction de sa capacité de régénération. Pour prendre cet aspect en compte, Schroeder and Mosheiff [237] considèrent par exemple qu'une fracture est critique si sa taille atteint $2.5$ fois le rayon de l'os long concerné.

### 1.3.3 Traitements actuels

A l'exception des lésions du crâne, pour lesquelles le tissu fibreux, trop proche du cerveau, est laissé en place, la prise en charge des lésions atrophiques, dont font partie les fractures de grande taille, commence par le retrait des tissus dévitalisés, recréant ainsi un espace vacant à combler [209]. Cette reconstruction se fait alors en deux étapes : tout d'abord, un soutien mécanique stable doit être apporté (plaques, vis, tiges médullaires). Puis, l'espace restant est comblé à l'aide d'un matériau favorisant la repousse osseuse [238, 237]. Ce dernier doit posséder des propriétés :

- d'ostéointégration, *i.e.* pouvoir s'intégrer au tissu osseux voisin de la fracture sans interface fibreuse
- d'ostéogénèse, *i.e.* permettre la différenciation des éventuelles cellules qu'il contient. Cela n'est possible que dans le cas d'une bonne ostéointégration.
- d'ostéoinduction, *i.e.* permettre le recrutement et/ou l'activation des cellules nécessaires au processus de cicatrisation

– d'ostéoconduction, *i.e.* offrir un support permettant la reconstruction d'un tissu osseux sain et vascularisé (angiogenèse).

Le comblement osseux, toutes techniques confondues, représentait déjà au début des années 2000 plus de 2 millions d'interventions chirurgicales par an à travers le monde, ce qui en fait la transplantation la plus courante après la transfusion sanguine [95]. Le développement de techniques chirurgicales variées, pouvant s'adapter aux différentes situations rencontrées et minimisant les effets secondaires associés, est donc un réel besoin clinique [237]. Avant d'aborder les recherches actuelles menées dans ce domaine, voici une liste (non exhaustive) des principales techniques thérapeutiques utilisées actuellement par les chirurgiens orthopédiques.

**La greffe autologue** Il s'agit de la technique la plus courante [238, 41]. Un échantillon d'os est prélevé au patient, le plus souvent sur la crête iliaque, puis morcelé et placé au cœur de la lésion. On parle alors de greffe non vascularisée, puisque les vaisseaux sanguins sont détruits pendant la procédure [238, 41, 209]. Cette technique a l'avantage d'amener un matériau vivant, qui possède une grande partie des composantes nécessaires à la reconstruction osseuse : des cellules osseuses capables de produire les facteurs biochimiques souhaités et de participer à la cicatrisation, et une matrice minéralisée comme support. De plus, le greffon provenant du patient, on s'affranchit des risques de rejet immunitaire [238]. En revanche, le réseau sanguin n'est pas préservé, et la lésion doit être revascularisée. Pour améliorer ce dernier point, une autre technique, appelée greffe vascularisée, consiste à prélever un segment osseux (le plus souvent sur la fibula) en préservant ses vaisseaux sanguins, puis à le placer au cœur de la lésion [192, 237].

Bien que couramment utilisées, ces deux méthodes présentent de nombreux inconvénients. Tout d'abord, le volume d'os disponible au prélèvement est limité, et peut s'avérer insuffisant dans le cas de grands volumes d'os manquants. Mais surtout, ce procédé entraîne l'apparition d'un deuxième site de lésion, augmentant ainsi les risques de complications, qui sont constatées sur le site de prélèvement dans près de $30\%$ des greffes iliaques (infections, douleurs récurrentes, hernie des organes internes) [41, 209, 238, 244].

**Les greffes allologues et xénologues** Face aux difficultés liées à la greffe autologue, des techniques de greffe allologue (greffon prélevé sur un donneur décédé) [95, 238] ou, pour certaines

applications dentaires, xénologue (greffon provenant d'une autre espèce animale) [111, 187] ont été mises au point. Dans les deux cas, le greffon osseux est débarrassé de sa fraction cellulaire et organique, puis stérilisé, avant d'être implanté sur le site de fracture. On évite ainsi la création d'une nouvelle lésion (liée au site de prélèvement), et la taille du greffon n'est plus limité par le volume disponible au prélèvement [237, 238].

En revanche, ces implants ne possèdent pas de propriétés ostéoinductrices, éliminées lors de la stérilisation, en dépit de laquelle une réponse immunitaire reste possible [167, 73]. De plus, on assiste souvent à une intégration partielle du greffon : la cicatrisation reste limitée aux zones proches des extrémités de la fracture, laissant le milieu de l'implant non colonisé par les cellules du patient. En l'absence de remodelage, le greffon se fragilise au fil du temps, et on constate $60\%$ de fracture au bout de 10 ans [271]. Pour essayer d'améliorer ces points, ces greffes sont parfois couplées à une injection de moelle osseuse (autologue), riche en cellules souches, au niveau du greffon [209, 237]. Enfin, cette méthode est dépendante de la disponibilité de greffons, qui sont, comme pour les autres tissus et organes, bien moins nombreux que le nombre de patients en attente de greffe.

**Les biomatériaux de comblement** Pour éviter les risques de rejet et ne plus dépendre de la disponibilité de greffons, de nombreux matériaux synthétiques de comblement osseux ont été mis au point. On distingue parmi eux trois types de matériaux : les biomatériaux métalliques (composants majeurs des prothèses), les biomatériaux polymères, et les céramiques. Ce sont ces deux derniers qui composent la plupart des biomatériaux utilisés pour le comblement osseux [194]. Ils se présentent sous différentes formes (blocs poreux ou non, granules, pâte injectable) [114] et sont de plus en plus perfectionnés. Nous en reparlerons plus longuement au paragraphe 1.4.3.

Néanmoins, ils ne possèdent pas de composante biologique. Utilisés seuls, ils peuvent donc conduire, comme les greffons allologues, à une cicatrisation uniquement périphérique [211]. Le cœur du biomatériau, non colonisé, se fragilise alors avec le temps, augmentant cette fois encore le risque de fractures. Ces biomatériaux sont donc également parfois couplés à des injections de moelle osseuse, pour améliorer leur efficacité [237].

**Les prothèses** Si la cicatrisation de la fracture, même à l'aide des différents protocoles de comblement, semble compromise, une solution alternative peut consister à poser une prothèse, en particulier si la lésion concernée est située à proximité d'une articulation (hanche, épaule, genou). Néanmoins, la durée de vie d'une prothèse est actuellement de 15 à 20 ans [193]. Il ne s'agit donc là que d'une solution provisoire, puisqu'une révision (remplacement de la prothèse) devra être effectuée une fois ce laps de temps écoulé. Cette durée de vie peut de plus être réduite en cas de problème de stabilité de la prothèse [237].

**La méthode Ilizarov** Cette méthode consiste à effectuer une section nette de l'os blessé dans une zone saine de ce dernier (en amont ou en aval de la fracture), puis à fixer autour du membre concerné un dispositif qui permettra de faire progressivement glisser le tronçon d'os ainsi obtenu d'une extrémité à l'autre de la fracture. La repousse osseuse s'effectue alors au niveau du nouveau site de lésion (*i.e.* au niveau de la section nette), entourée de tissus sains à fort potentiel de cicatrisation [115, 161]. Si elle permet de prendre en charge des pertes osseuses importantes, cette méthode est extrêmement contraignante et douloureuse pour le patient. Les risques d'infection sont également élevés, en raison notamment des fixations externes utilisées pour effectuer le transport du tronçon d'os découpé [237].

### 1.3.4 Bilan

Les techniques actuellement disponibles pour prendre en charge les lésions de grande taille nécessitent toutes une immobilisation longue du patient, qui peut avoir des effets secondaires importants, en particulier pour les personnes âgées ou affaiblies. De plus, la cicatrisation obtenue n'est pas toujours totale, ce qui se traduit le cas échéant par une perte de mobilité ou de fonctionnalité, totale ou partielle, du membre concerné. Les risques d'infection associées sont également importants, soit à cause des greffons utilisés, soit en raison du nombre élevé de procédures chirurgicales. Enfin, ces méthodes ne sont pas forcément adaptées aux lésions osseuses de très grande taille (de l'ordre de la dizaine de centimètres).

Compte tenu du nombre important de cas nécessitant ce type de comblement, il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies, plus efficaces et moins contraignantes pour le patient. Ces stratégies devraient allier support mécanique et activité biologique stimulant la repousse osseuse,

en couplant des matériaux spécialement développés à des cellules et des facteurs biochimiques. Ce type de procédés est à la base du domaine de l'ingénierie tissulaire.

## 1.4 L'ingénierie tissulaire osseuse

Face au manque de tissus et d'organes disponibles d'une part, et aux risques virologiques et immunitaires inhérents aux allogreffes et xénogreffes d'autre part [73], la recherche s'est tournée depuis une vingtaine d'années vers le développement de nouvelles techniques permettant de former des tissus fonctionnels *in vitro*, à partir de matériaux synthétiques adaptés et de cellules du patient : c'est le principe de l'ingénierie tissulaire. Représentant un marché de plus de 3 milliards de dollars en 2011 et actuellement en pleine croissance (près de $50\%$ de croissance entre 2007 et 2011) [118], cette nouvelle approche représente une évolution majeure bien au-delà du domaine de la réparation ostéo-articulaire, puisqu'elle concerne *a priori* tous les tissus humains [273, 68]. De nombreux projets sont ainsi actuellement à l'étude pour reconstruire (de manière non exhaustive) les tissus du coeur, de la peau et de la cornée, ainsi que les nerfs, les muscles, le pancréas et les artères.

### 1.4.1 Principe de l'ingénierie tissulaire

Bien que le concept paraisse simple, il est difficile de donner une définition précise de ce qu'est l'ingénierie tissulaire car, ce domaine étant récent, ses limites sont encore mal définies. Ainsi, plusieurs définitions ont été successivement proposées, certaines s'appuyant sur le côté pluridisciplinaire de cette approche, d'autres sur son application. Une définition communément admise est celle de Williams [274] : "L'ingénierie tissulaire consiste à persuader le corps de se réparer lui-même en apportant les cellules, les signaux moléculaires et les structures de support appropriés à la zone concernée". Elle n'apporte ainsi aucune restriction sur les disciplines scientifiques entrant en jeu dans le développement de telles thérapies [68].

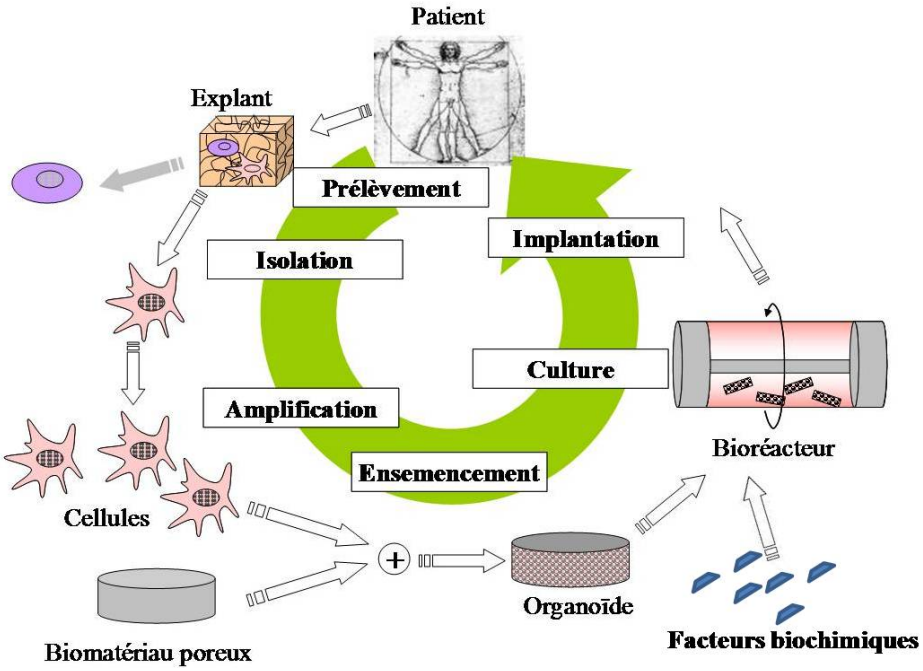



FIGURE 1.6 – Les différentes étapes de développement d'un implant issu de l'ingénierie tissulaire. Image adaptée de Pierre [214].

La figure 1.6 propose une représentation schématique des différentes étapes nécessaires à l'obtention d'implant issu de l'ingénierie tissulaire [64, 269, 142]. A partir d'un prélèvement de tissu effectué sur le patient, il faut isoler les cellules qui serviront à la construction de l'implant des autres types cellulaires présents dans l'échantillon recueilli, et de la matrice extracellulaire si elle existe (dans le cas du prélèvement de cartilage par exemple). Le volume de tissu prélevé étant limité, pour minimiser les risques d'effets secondaires, le nombre de cellules isolées est généralement insuffisant pour construire un implant de qualité satisfaisante. On réalise alors une phase d'amplification, durant laquelle les cellules sont cultivées *in vitro* dans des conditions qui favorisent leur prolifération. Une fois le nombre de cellules requis obtenu, ces dernières sont ensemencées dans un biomatériau qui servira de structure au futur tissu, et de support de développement aux cellules. L'ensemble cellules/biomatériau est appelé *organoïde* (ou matériau hybride). Ce dernier est ensuite placé dans une enceinte fermée et cultivé *in vitro* jusqu'à ce qu'il ait atteint le niveau de maturité nécessaire à son implantation dans l'organisme. Durant cette phase de culture, de nombreuses stimulations, notamment biochimiques, permettent de se rapprocher des conditions de développement tissulaire *in vivo*, et de réguler ainsi l'activité et le développement des cellules ensemencées.

La construction d'un tissu par un procédé d'ingénierie tissulaire repose donc sur quatre acteurs principaux : les cellules qui seront à l'origine de la repousse du tissu, le biomatériau qui apporte la structure de support, et les facteurs biochimiques qui permettent d'orienter l'activité cellulaire. Enfin, il convient d'ajouter le bioréacteur, garant des conditions de développement *in vitro* – et donc de la qualité – du futur implant.

Nous allons donc à présent nous intéresser aux rôles joués par ces quatre éléments lors du développement d'implants issus de l'ingénierie tissulaire, en mettant l'accent sur les procédés destinés à la réparation osseuse.

### 1.4.2 Les cellules

Le type de cellules utilisé pour la conception d'un implant issu de l'ingénierie tissulaire doit satisfaire plusieurs critères. Il doit tout d'abord pouvoir être facilement prélevé chez le patient et, le cas échéant, isolé du reste de l'échantillon recueilli. S'il s'agit d'un type cellulaire en nombre peu élevé (cellules souches), il doit pouvoir être facilement amplifié *in vitro*, et donc posséder une forte capacité de prolifération. Enfin, il doit bien sûr permettre la construction du tissu souhaité. Le tableau 1.7 regroupe quelques types cellulaires utilisés pour l'obtention d'implants de réparation tissulaire osseuse.

| | Technical requirements | | | | Therapeutical requirements | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Collection | Culture | Expansion | Storage | Bone formation | No-immuno-logical reaction | No pro-inflammatory reaction |
| Bone Marrow cells | ++ | NA | NA | NA | + | NA | ++ |
| Mesenchymal stem cells | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Pre-osteoblasts | + | ++ | + | + | ++ | NA | ++ |
| Genetically modified cells[1] | ++ | +[2] | ++ | + | +++ | +[3] | ++ |
| Foetal bone cells | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++[4] |

[1] Ex vivo gene therapy
[2] Effectiveness stability of the transfection may be difficult to obtain. Thus, the duration of the transfect expression could be affected.
[3] Depending on the vectors used even for autologous transplantation
[4] Foetal cells not only induce no pro-inflammatory reaction, but were able to decrease inflammation at the wounded site

FIGURE 1.7 – Types cellulaires fréquemment utilisés pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Tableau issu de Pioletti et al. [215]. NA : Non applicable.

Parmi les types cellulaires étudiés, les cellules souches mésenchymateuses sont largement utilisées en raison de leur forte capacité de prolifération [189], de leur rôle important dans le mécanisme

de cicatrisation [17, 174] et de leur capacité à se différencier en divers types cellulaires du système ostéo-articulaire [16]. Mais elles nécessitent un travail d'isolation et une forte amplification avant leur ensemencement, susceptible d'altérer leurs propriétés.

L'utilisation du prélèvement de moelle osseuse complet permet de simplifier ce protocole, et d'apporter au sein du futur implant d'autres types cellulaires, dont les cellules souches hématopoïétiques dont dérivent les ostéoclastes [211, 232]. Néanmoins, cette diversité de types cellulaires rend plus difficile le contrôle de la différenciation cellulaire et l'obtention du tissu souhaité. De plus, la fraction volumique de cellules souches étant très faible au sein de la moelle osseuse, le nombre de cellules progénitrices implantées dans l'échantillon en suivant ce procédé est bien plus faible que pour les cellules souches mésenchymateuses amplifiées *in vitro* [189].

Les cellules pré-différenciées (ostéoblastes ou pré-ostéoblastes pour l'os, chondroblastes pour le cartilage), si elles possèdent une capacité de prolifération limitée, permettent en revanche une production plus abondante et plus rapide de matrice extracellulaire, puisqu'elles sont déjà fonctionnelles et n'ont pas besoin d'être orientées [215, 189]. Elle peuvent de plus produire certains facteurs biochimiques spécifiques activant le processus de reconstruction.

Par ailleurs, lors de la mise au point de protocoles en laboratoire, il peut être utile d'utiliser des cellules de souris immortalisées (MC3T3 par exemple) [126, 7], pour s'assurer une ressource importante de cellules aux caractéristiques contrôlées. Des études ont également été réalisées sur des cellules modifiées génétiquement pour exprimer un facteur biochimique particulier (BMP par exemple) [215].

Enfin, même si ces études sont interdites en France, des tests ont été réalisés dans d'autres pays à partir de cellules embryonnaires humaines, qui présentent des capacités de prolifération, de différenciation et de construction supérieures aux cellules de l'adulte [215]. Des cellules vasculaires peuvent également être couplées aux cellules ostéogéniques, pour faciliter la revascularisation de la lésion après implantation [189].

### 1.4.3 Les biomatériaux

Les biomatériaux utilisés pour le développement d'implants tissulaires servent de structure d'accueil aux cellules, pour leur permettre de construire un tissu tridimensionnel. Ils ont ainsi un

double rôle dans le processus de réparation osseuse : biologique et mécanique [257]. Cette double fonction définit les critères de choix du matériau à utiliser. D'un point de vue biologique, il doit tout d'abord être biocompatible, *i.e.* être accepté par l'organisme sans déclencher de réaction de rejet immunitaire (pour une définition complète de la biocompatibilité, cf. Williams [272]). Il doit également favoriser l'adhésion, la prolifération puis la différenciation des cellules qu'il abrite, et permettre une production adéquate de matrice extracellulaire [119, 180]. Les biomatériaux qui contiennent des agents chimiques favorisant l'activité cellulaire (facteurs de croissance, hormones) sont dits *bioactifs* [117]. Il est de plus préférable que ce support puisse être résorbé progressivement une fois implanté au sein de l'organisme, au fur et à mesure que le nouveau tissu s'étoffe. Dans ce cas, sa vitesse de résorption doit être adaptée à la vitesse de croissance du tissu en construction, pour assurer l'intégrité du nouvel organe formé [119].

D'un point de vue mécanique, le matériau choisi doit pouvoir assurer une fonction de soutien au sein de l'organisme pendant la cicatrisation de la lésion [257, 229]. De plus, sa microstructure (forme et taille des pores) influence, le cas échéant, la direction prise par les cellules souches qu'il contient, lors de leur différenciation. Il semble ainsi qu'une taille de pores supérieure à $150$ $\mu$m favorise le développement d'un tissu osseux [122, 124]. Ce réseau poreux doit aussi permettre un apport suffisant de fluide de culture aux cellules pendant la période de développement *in vitro*, afin de maintenir un environnement biochimique satisfaisant (nutriments, oxygène, pH, etc).

Plusieurs types de matériaux ont donc été testés dans le cadre de l'ingénierie ostéo-articulaire. Si certaines études ont été menées à l'aide de matériaux poreux métalliques [255, 176], la plupart des matériaux utilisés sont des des polymères ou céramiques. Ces dernières peuvent être synthétiques (le plus souvent à base d'hydroxyapatite et/ou de phosphate tricalcique) [229, 95] ou naturelles (coraux, matrice osseuse déminéralisée) [211, 180]. Leur composition est proche de celle de la matrice minérale de l'os, ce qui en fait d'excellents candidats pour l'ingénierie tissulaire osseuse. De plus, les céramiques synthétiques telles que l'hydroxyapatite ont un impact positif sur le développement des cellules osseuses en leur sein [229], et leur fabrication peut facilement être contrôlée. Elles sont donc largement adoptées pour ce type d'études. Les matériaux polymères, eux, ont une composition chimique plus éloignée de celle de la matrice osseuse. Mais leur procédé de fabrication permet de contrôler parfaitement la taille et la forme des pores qu'ils contiennent [122], contrairement aux céramiques pour lesquelles le nombre de structures poreuses réalisables

reste limité. La nature des polymères utilisés pour la fabrication de tels biomatériaux est extrêmement variée. Une description détaillée peut être trouvée dans l'article de revue de Jagur-Grodzinski [117].

Enfin, plusieurs types de structures poreuses sont également utilisées, parmi lesquelles on retrouve les mousses (généralement polymères) et les maillages de fibres, dont le taux de porosité peut dépasser $90\%$, et les structures alvéolaires (céramiques), dont la porosité est généralement comprise entre $60\%$ et $80\%$ (pour une revue sur les différentes structures et natures des biomatériaux ostéo-articulaires, voir l'article de Karageorgiou and Kaplan [122]). Si les porosités très élevées favorisent la colonisation cellulaire, elles sont en revanche souvent associées à des propriétés mécaniques insuffisantes pour assurer la fonction de maintien requise au sein de l'organisme. De tels implants ne pourraient donc être destinés qu'à des zones très peu sollicitées mécaniquement.

### 1.4.4 Les bioréacteurs et les facteurs de croissance

Une fois les cellules mises en contact avec le biomatériau choisi, le matériau hybride (ou organoïde) obtenu est cultivé *in vitro* jusqu'à ce qu'il ait atteint un niveau de maturité suffisant pour être implanté sur le site de la lésion à soigner. Il est pour cela placé dans une enceinte fermée, *le bioréacteur*, qui permet de maintenir des conditions environnementales appropriées à son développement. Les futurs implants sont ainsi conservés à une température de $37^{\circ}C$ (température corporelle), dans une atmosphère humide et à taux d'oxygène ($21\%$ sauf pour les études menées en hypoxie) et de dioxyde de carbone (généralement $5\%$) contrôlés. Ils sont également plongés dans un milieu de culture au pH stable, contenant les nutriments nécessaires à leur développement et renouvelé régulièrement.

Afin de pallier le manque de propriétés ostéoinductives des biomatériaux synthétiques, des agents biochimiques peuvent être ajoutés à ce milieu de culture, pour orienter l'activité cellulaire. Parmi ces facteurs, on compte des facteurs de croissance (BMP : *Bone Morphogenetic Protein*, PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*, PTN : *Pleiotrophin*, TGF$\beta$ : *Transforming Growth Factor*$\beta$, entre autres) et des facteurs facilitant l'angiogenèse (VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*, Angiopoïétine I) [119]. Des ligands facilitant l'adhésion cellulaire peuvent également être fixés à la surface des biomatériaux. Une liste détaillée des différents facteurs biochimiques utilisés

peut être trouvée dans l'article de van Gaalen et al. [257].

Les premières cultures d'organoïdes ont été effectuées dans des boîtes de Pétri ou des puits de culture. Ces cultures sont dites *statiques*, car le fluide de culture dans lequel baignent les échantillons n'est pas mis en mouvement. Dans cette configuration, l'oxygène et les nutriments nécessaires à la survie des cellules pénètrent dans l'implant sous la seule action d'un flux diffusif, qui s'avère être insuffisant pour assurer des concentrations stables au coeur d'implants au volume important (de plusieurs millimètres d'épaisseur). De nouveau types de bioréacteurs, mettant en mouvement le fluide de culture, ont donc été développés pour augmenter le transport des différentes espèces chimiques, grâce à la présence d'un flux convectif [270, 178]. On parle dans ce cas de *cultures dynamiques*, par opposition au cas précédent.

Par ailleurs, l'environnement mécanique dans lequel se trouvent les cellules joue un rôle important dans leur développement. Il a ainsi été montré que les cellules ostéo-articulaires étaient sensibles à l'écoulement du fluide dans lequel elles baignent, et plus particulièrement au cisaillement qu'il engendre à leur surface. La présence d'un tel écoulement permet donc de favoriser le développement du tissu, et participe à l'orientation des cellules dans la direction souhaitée [278, 219].

Parmi les nombreux dispositifs de culture dynamique mis au point (voir figure 1.8), trois configurations sont fréquemment utilisées lors de la conception d'implants ostéo-articulaires : les bioréacteurs à agitation, les bioréacteurs à flux parallèles et les bioréacteurs à perfusion.

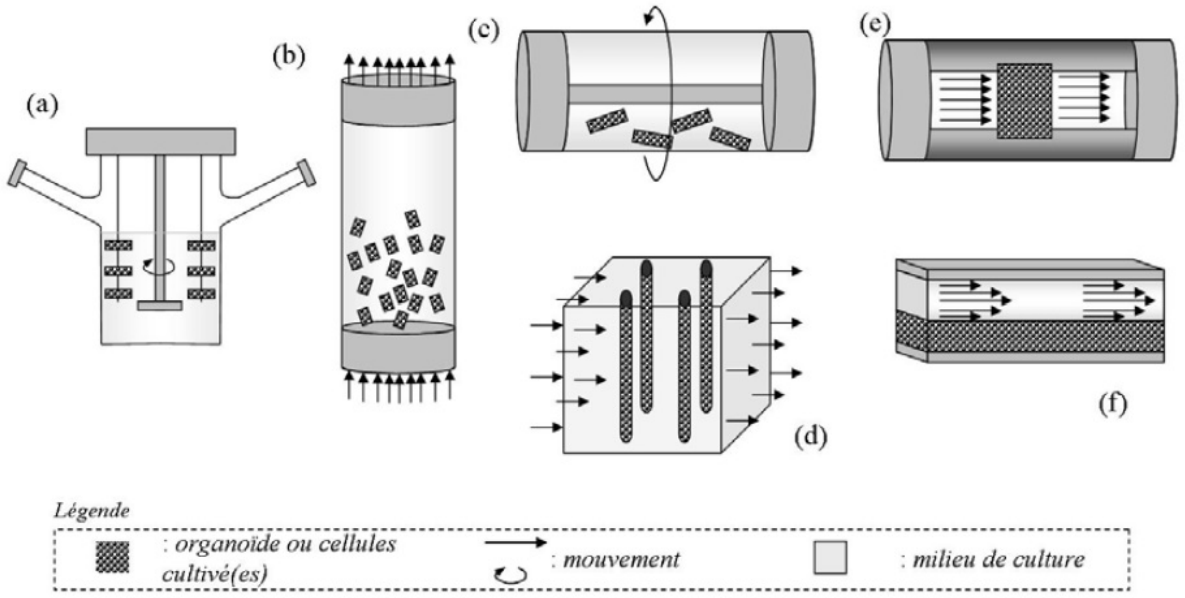



FIGURE 1.8 – Principaux types de bioréacteurs utilisés en ingénierie tissulaire. a) *spinner flask*, b) bioréacteur à lit fluidisé, c) bioréacteur rotatif, d) bioréacteur à fibres creuses, e) bioréacteur à perfusion, f) bioréacteur à plans parallèles. Image issue de Oddou et al. [204]

Les bioréacteurs à agitation consistent à plonger les échantillons dans un grand volume de fluide de culture, agité en permanence. On trouve par exemple dans cette catégorie les *spinner flasks* (figure 1.8.a) [246, 258] – dans lesquelles les échantillons sont accrochés à un mât plongé dans le fluide, ce dernier étant mis en mouvement à l'aide d'un agitateur magnétique, les bioréacteurs à lit fluidisés (figure 1.8.b) [57] – où le fluide traverse une chambre d'écoulement au sein de laquelle les échantillons peuvent bouger librement, et les bioréacteurs rotatifs (figure 1.8.c) [22, 242] – pour lesquels le bioréacteur, cylindrique, est en rotation constante autour de son axe principal. Ces dispositifs permettent d'améliorer le taux d'oxygénation au sein du biomatériau, et d'apporter une plus grande quantité de nutriments à sa surface, grâce au flux convectif ainsi généré. Il a d'ailleurs été constaté que cette configuration permet d'améliorer le taux de survie cellulaire et la quantité de matrice extracellulaire produite par les cellules. Mais ces effets sont concentrés dans une couronne d'environ 1 mm d'épaisseur autour de la surface, des gradients importants de nutriments et d'activité cellulaire étant constatés dès qu'on s'éloigne de cette zone en direction du centre de l'implant [278, 30].

Les bioréacteurs à flux parallèles, dans lesquels l'écoulement du fluide se fait autour du biomatériau, permettent également d'augmenter l'apport en nutriments et en oxygène à la surface de ce

dernier. Dans cette catégorie, on trouve les bioréacteurs à fibres creuses (figure 1.8.d) [67] – dans lesquels les échantillons sont placés à l'intérieur d'une fibre creuse autour de laquelle s'écoule le fluide, le transport des espèces chimiques à l'intérieur de la fibre se faisant pas diffusion, et les bioréacteurs à plans parallèles [90, 143] (figure 1.8.f) – où le fluide s'écoule parallèlement à la surface de l'implant (d'un seul côté ou de part et d'autre de ce dernier). Mais, cette fois encore, la pénétration des espèces chimiques au sein de l'échantillon reste limitée, car elle est uniquement assurée par des phénomènes de diffusion. Ces procédés ne permettent donc pas de maintenir en culture des implants ostéo-articulaires de grande taille dans des conditions satisfaisantes. La principale limite de ces deux types de bioréacteurs vient du fait que l'écoulement du fluide reste très limité au coeur du biomatériau.

Pour améliorer cet aspect, des bioréacteurs à perfusion ont été mis au point [267, 241, 44]. Dans cette configuration, l'échantillon est fixé hermétiquement au coeur d'un conduit, au sein duquel on impose un écoulement de fluide. Ainsi, le fluide traverse entièrement l'échantillon, et l'apport en nutriments et en oxygène se fait par convection dans tout le volume de l'implant. Ces dispositifs permettent d'améliorer le taux de survie cellulaire et la production de matrice extracellulaire dans tout le volume de l'implant, et font grandement diminuer la présence de gradients de concentrations chimiques [278]. Ils constituent donc une option très prometteuse pour la culture d'implants ostéo-articulaires tridimensionnels. Néanmoins, dans les derniers temps de culture, lorsque la matrice extracellulaire remplit une grande partie des pores du biomatériau, la perfusion devient plus difficile à réaliser, et les sollicitations mécaniques associées à l'écoulement requis pour assurer un apport en nutriment satisfaisant pourraient s'avérer dommageables pour les cellules et le tissu en développement (voir paragraphe 2.4). De même, on constate que les implants actuellement cultivés avec ce type de bioréacteurs ne dépassent pas quelques millimètres d'épaisseur (voir chapitre 3). On peut donc se demander si ce type de dispositifs serait suffisant pour mettre au point des implants couvrant la plage de tailles d'intérêt clinique, qui peut aller jusqu'à une dizaine de centimètres.

### 1.4.5 Bilan

L'ingénierie tissulaire est un domaine actuellement en plein développement, qui permet de proposer des solutions alternatives aux greffes autologues et allologues, et de s'affranchir ainsi

des contraintes et des effets secondaires importants qui leur sont associés. Dans le domaine de la réparation ostéo-articulaire, et plus particulièrement de la prise en charge des fractures de grande taille, de nombreux types cellulaires et biomatériaux supports sont à l'étude. Néanmoins, les cellules souches mésenchymateuses sont utilisées dans une très grande part des travaux, en raison de leur rôle particulier au cours du processus de cicatrisation osseuse.

La structure poreuse et la nature des biomatériaux doivent être étudiées pour optimiser l'activité cellulaire et le transport des espèces chimiques au sein de l'organoïde, sans détériorer les propriétés mécaniques de ce dernier, qui devra assurer une fonction de support après son implantation au sein de l'organisme.

Le principal problème réside dans la capacité à maintenir des organoïdes de grande taille en culture dans des conditions d'oxygénation et d'apport en nutriments satisfaisantes. Les bioréacteurs à perfusion semblent constituer une solution prometteuse, mais les échantillons pour lesquels ils sont utilisés dépassent rarement quelques millimètres d'épaisseur à l'heure actuelle. Il serait donc intéressant de voir si ces dispositifs sont adaptés à la culture d'implants au volume plus conséquent, qui correspondent aux tailles cliniques des lésions à combler.

## 1.5 Le cas du périoste

Grâce à sa forte vascularisation et aux nombreuses cellules souches qu'il abrite, le périoste joue un rôle important dans l'entretien et la réparation des os qu'il entoure. Il a ainsi été constaté que les fractures cicatrisent moins rapidement si le périoste des zones environnantes est abîmé [209]. Les chirurgiens orthopédiques ont donc développé des techniques opératoires tirant partie des capacités de cicatrisation de cette membrane.

Parmi ces procédures, on peut citer la technique de la membrane induite, aussi appelée technique de Masquelet [173]. Cette méthode de réparation s'effectue en deux temps : lors d'une première intervention, juste après le traumatisme, la lésion est débarrassée des tissus endommagés, puis une résine en polymère (ou un ciment) est injecté pour combler l'espace créé par l'os manquant. Les tissus mous voisins sont ensuite suturés autour de la lésion, et la plaie est refermée. Au bout de 6 à 8 semaines, les tissus mous entourant la lésion ont cicatrisé et une membrane entoure le bloc de ciment ou de résine. Une deuxième intervention est alors pratiquée, durant laquelle ce bloc

est délicatement retiré, sans abîmer cette nouvelle membrane, qui joue alors le rôle de périoste, et l'espace libre est comblé avec une autogreffe d'os spongieux. On obtient ainsi une consolidation complète des fractures en quelques mois [281, 74]. Néanmoins, cette technique nécessite deux interventions différentes et une autogreffe, qui sont autant de sources possibles de complications (voir paragraphe 1.3.3).

Une autre méthode, s'appuyant elle uniquement sur les capacités cicatrisantes du périoste, a été mise au point par Knothe and Springfield [127]. Elle permet de prendre en charge des fractures critiques à l'aide d'une seule intervention, et ne nécessite pas d'être couplée à une greffe de tissu osseux. Son principe est décrit sur la figure 1.9.

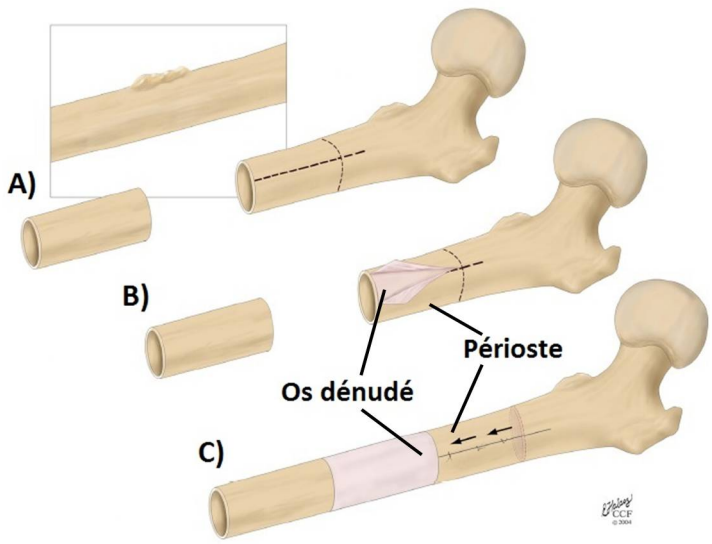



FIGURE 1.9 – Procédure chirurgicale développée par Knothe and Springfield [127] permettant de prendre en charge des fractures de grande taille. Image adaptée de Knothe and Springfield [127].

Au cours de l'intervention, le périoste d'une partie du segment osseux situé en amont de la fracture est délicatement détaché de l'os sous-jacent, en prenant garde à préserver le réseau vasculaire qu'il contient (figure 1.9.A). Un segment de cet os dénudé, de la taille du défaut à combler, est alors détaché de l'os sain (figure 1.9.B), puis glissé vers l'extrémité aval de la fracture, pour combler l'espace vacant au niveau de la lésion (figure 1.9.C). L'ensemble est ensuite stabilisé avec une tige médullaire. Le périoste détaché est enfin recousu autour de la nouvelle zone de lésion, laissée vide. A la fin de cette intervention, l'os concerné comprend donc une zone contenant uniquement du périoste, formant une chemise autour de la nouvelle lésion, et une zone contenant du

tissu osseux vascularisé démuni de périoste, à l'endroit de la lésion primaire, au milieu de deux segments d'os et de périoste intacts. On a ainsi remplacé le défaut à combler situé dans une zone à faible capacité de cicatrisation par un nouveau défaut, entouré de tissus sains et à forte capacité de régénération.

L'utilisation de cette technique permet d'observer, en moins de 3 semaines, le remplissage du nouveau défaut par un tissu osseux immature, qui est ensuite progressivement remodelé pour donner un os fonctionnel dans un délai de 6 mois après l'opération [127, 128].

Si elle semble extrêmement prometteuse en raison des résultats rapides qu'elle procure et de son invasivité limitée (une seule intervention, pas de greffe associée), cette technique reste limitée par la quantité de tissu sain disponible à proximité de la lésion. Elle ne peut donc pas être utilisée en l'état pour des lésions de très grande taille. De plus, les mécanismes à l'origine de cette régénération rapide sont encore mal connus. Dans le cadre de ce travail, j'ai eu l'occasion de réaliser une mission de trois mois au sein de l'équipe du professeur Melissa L. Knothe Tate (Department of Biomedical Engineering, Case Western Reserve University, Ohio, USA), qui travaille à la compréhension des phénomènes physico-chimiques à l'origine des propriétés de régénération particulières du périoste.

## 1.6 Conclusion

Les fractures critiques (ou de grande taille) font partie des lésions qui ne bénéficient pas à l'heure actuelle de prise en charge clinique satisfaisante, et qui ont des conséquences importantes sur la qualité de vie des patients touchés. En effet, les stratégies thérapeutiques utilisées actuellement sont lourdes et contraignantes, et ne suffisent pas toujours à éviter l'apparition de séquelles plus ou moins invalidantes.

Face à la nécessité de mettre au point de nouveaux protocoles, moins contraignants et plus performants, de nombreuses études sont actuellement menées pour, notamment, développer des implants issus de l'ingénierie tissulaire. Mais la taille des lésions à traiter reste une difficulté majeure, tant pour obtenir une colonisation cellulaire satisfaisante des substrats poreux que pour maintenir un environnement physico-chimique adéquat après la phase d'ensemencement. Une autre stratégie consiste à utiliser les propriétés régénératrices du périoste pour obtenir une cicatrisation accélérée

de la zone lésée. Mais cette technique est limitée par la quantité de périoste disponible autour de la lésion. Il serait donc intéressant de pouvoir produire artificiellement une membrane aux propriétés semblables.

Les phénomènes de transport (cellulaire et chimique) constituent donc un paramètre clé de ces deux stratégies thérapeutiques : pour la première, il s'agit d'amener des cellules puis des facteurs chimiques au coeur d'un milieu poreux en évolution, afin d'assurer un développement adéquat des implants. Pour la deuxième, il convient d'identifier, puis de caractériser, les phénomènes physico-chimiques à l'origine des propriétés de membrane particulières du périoste. Dans ce travail, on cherchera ainsi à identifier les mécanismes de transport mis en jeu dans ces deux cas, en couplant études expérimentales et modélisation numérique.

# Chapitre 2

# Phénomènes de transport au sein du tissu osseux

LES phénomènes de transport aux sein des milieux poreux ont un rôle central dans de nombreux domaines, aux champs d'applications variés, tels que l'étude des sols (phénomènes d'hydratation), l'ingénierie chimique ou encore les sciences de l'environnement (propagation ou captation des polluants). Dans le cadre de la biologie animale, ces phénomènes se trouvent au cœur du fonctionnement de plusieurs organes : les nombreuses membranes filtrantes (parois intestinales, périoste, reins,...) présentes dans l'organisme se servent par exemple de leurs propriétés de transport, fortement variables d'une espèce chimique à l'autre, pour réguler les échanges entre les différents systèmes, et participer ainsi à la protection des différents organes. Au sein du squelette, plusieurs niveaux de réseaux poreux permettent de contrôler les paramètres physico-chimiques nécessaires au bon fonctionnement des tissus ostéo-articulaires (transport de nutriments et de déchets, régulation du pH), et sont le siège de la communication cellulaire paracrine.

En ingénierie tissulaire, quel que soit le tissu étudié, la perfusion des implants par un fluide de culture au sein du bioréacteur mis en place est essentielle à leur développement. D'un point de vue biochimique, elle permet un apport contrôlé en nutriments et en oxygène, assure l'évacuation des déchets issus de l'activité cellulaire, et garantit la stabilité du pH du milieu extracellulaire. Sur le plan mécanique, il a été démontré que, associé aux propriétés mécaniques du substrat sur lequel reposent les cellules, l'écoulement d'un fluide, en stimulant la paroi cellulaire, permet d'orienter

leur différenciation, puis la structuration des tissus, dans la direction souhaitée [270].

Le domaine de la réparation osseuse fait intervenir plusieurs milieux poreux complexes : le tissu osseux, le périoste et les implants en biomatériaux. Ces milieux contiennent tous différentes échelles de porosité : des canaux de Havers à la matrice péricellulaire occupant les canalicules de l'os, des espaces interfibres aux jonctions cellulaires (*"tight junctions"*) pour le périoste, et de la microéchelle à la nanoéchelle pour les biomatériaux actuellement en développement [60]. Ils ont en revanche des géométries et des architectures de porosité très variées. Pour comprendre les phénomènes mis en jeux lors de la perfusion de ces tissus par un fluide, que ce soit dans leur environnement *in vivo* ou lors de la culture d'implants *in vitro*, il convient donc de s'appuyer sur la théorie des phénomènes de transport en milieu poreux.

L'objectif de ce chapitre est de dégager des outils de modélisation utiles d'une part au développement puis à l'optimisation d'un bioréacteur dédié au développement d'implants osseux de grande taille, et d'autre part à la compréhension de phénomènes de transport, notamment au sein du périoste, semblant avoir un effet majeur sur la cicatrisation des lésions osseuses [132, 128].

Pour cela, nous avons choisi de nous intéresser à l'étude du tissu osseux cortical, qui présente plusieurs intérêts. Tout d'abord, il possède un double niveau de porosité, microscopique et nanoscopique, le premier correspondant à l'échelle des pores des biomatériaux qui seront utilisés au sein du bioréacteur, et le deuxième à l'échelle des pores du périoste. Ensuite, il s'agit d'un tissu présent au niveau des lésions, qui constitue donc une partie du milieu environnant des implants *in situ*. Enfin, l'étude des phénomènes de transport au sein de ce tissu au niveau du réseau lacuno-canaliculaire, et en particulier la détermination de sa perméabilité, constitue un problème d'actualité dans la communauté biomécanique, en raison notamment de l'écart important observé entre les mesures expérimentales et les modèles théoriques [35].

## Présentation du problème : estimer la perméabilité du tissu osseux cortical

Les tissus ostéo-articulaires sont des milieux poreux complexes constitués d'une matrice solide saturée par une phase fluide, abritant différents types de cellules. Pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'adaptation osseuse et de certaines pathologies de l'os, il est important de décrire de manière très précise l'environnement physique des cellules *in vivo*.

Les interactions fluide-structure, en particulier, jouent un rôle déterminant dans le processus de remodelage osseux [82]. Les ostéocytes, cellules mécano-sensibles du tissu osseux, sont en effet capables de transformer les signaux mécaniques perçus à leur surface en signaux biochimiques [31]. Mais, à cause de la forte hétérogénéité du tissu osseux et de la structure muti-échelle de sa porosité – de la vascularité sanguine (pores de l'ordre de $10$ $\mu$m) au réseau lacuno-canaliculaire (taille des canalicules entre $0.01$ et $0.1$ $\mu$m, taille des lacunes entre $1$ et $10$ $\mu$m) [49], il est à l'heure actuelle toujours très difficile de caractériser avec précision les champs de pression et de vitesse du fluide interstitiel au voisinage de ces cellules.

Cet écoulement interstitiel étant dû aux déformations mécaniques subies par la matrice solide, la théorie de poroélasticité de Biot a souvent été utilisée pour décrire le comportement du tissu osseux [48]. Selon cette théorie, la capacité de l'os à être traversé par un fluide est quantifiée par sa perméabilité intrinsèque ($\mathrm{m}^2$). Dans un milieu anisotrope, cette perméabilité est caractérisée par un tenseur d'ordre $2$, symétrique et défini positif. Pour les milieux isotropes en revanche, ce tenseur peut être caractérisé par un unique scalaire $\kappa$. Ce dernier est un paramètre textural dépendant uniquement de la géométrie du réseau de porosité [204]. Ainsi, une détermination précise de $\kappa$ à l'échelle cellulaire (perméabilité intrinsèque lacuno-canaliculaire) permettrait de mieux comprendre le mécanisme de mécano-sensation mis en jeu par ces cellules. En effet, $\kappa$ fait partie des paramètres d'entrée utilisés par de nombreux modèles visant à décrire le comportement du tissu osseux et, en particulier, de modèles poroélastiques des écoulements microscopiques au sein de l'os cortical [282, 162, 283, 261, 245, 100, 76, 147, 286, 224, 94, 51, 198, 199, 200, 84, 275, 14, 163, 103].

La manière la plus simple de déterminer la perméabilité d'un milieu poreux consiste à appliquer un gradient de pression de part et d'autre d'un échantillon de ce dernier et à mesurer le flux de fluide qui en résulte [55]. Les mesures classiques de perméabilité du tissu osseux s'appuient sur cette méthode, et conduisent à des valeurs comprises entre $10^{-15}$ et $10^{-9}$ $\mathrm{m}^2$ [156, 88], même si des mesures récentes effectuées sur l'os cortical de chien adulte ont donné des résultats inférieurs à $4\times10^{-17}$ $\mathrm{m}^2$. Ces expériences ayant été réalisées sur le tissu osseux entier, les valeurs de $\kappa$ obtenues dans ces études correspondent à une perméabilité effective prenant en compte les différents niveaux de porosité (vasculaire et lacuno-canaliculaire), et tenant compte ou non, selon les expériences, de la présence de matrice organique au sein des pores.

La distribution spatiale des différents réseaux de porosité au sein de l'os cortical (voir chapitre 1) est telle que la perméabilité totale de ce tissu est principalement due à la porosité la plus large, i.e. au réseau vasculaire. Ainsi, les protocoles de mesure classiques ne sont pas adaptés à la caractérisation de l'environnement hydraulique des ostéocytes. Pour pallier ce problème, et à la suite des travaux de Weinbaum et al. [265], des approches théoriques s'appuyant sur le modèle de Biot et sur des considérations anatomiques ont été développées. Plusieurs estimations théoriques de la perméabilité intrinsèque lacuno-canaliculaire ont ainsi été réalisées par différentes équipes, conduisant à des valeurs de $\kappa$ allant de $10^{-22}$ à $10^{-18}$ m$^2$ (voir tableau 2.1). Plus récemment, de nouveaux protocoles expérimentaux ont abouti à des estimations très faibles de $\kappa$, comprises entre $10^{-25}$ et $10^{-22}$ m$^2$. Comme indiqué dans le tableau 2.1, ces nouvelles mesures ont été réalisées à l'aide de techniques récentes couplées à des modèles poroélastiques, et concernent différentes parties du tissu osseux.

| Ref. | Permeabilité (m$^2$) | Remarques |
|---|---|---|
| Estimations théoriques | | |
| Weinbaum et al. [265] | $1.02 \times 10^{-20}$ | matrice péricellulaire isotrope |
| Zhang et al. [283] | $1.47 \times 10^{-20}$ | adaptation de Weinbaum et al. [265] |
| Wang et al. [261] | $\{0.1 - 13\} \times 10^{-20}$ | adaptation de Weinbaum et al. [265] |
| Smit et al. [243] | $2.2 \times 10^{-22}$ | MEF* et interpolation des données électriques de Otter et al. [207] |
| Gururaja et al. [100] | $\{0.67 - 7.5\} \times 10^{-20}$ | matrice péricellulaire anisotrope, adaptation de Weinbaum et al. [265] |
| Beno et al. [15] | $\{1 - 1500\} \times 10^{-22}$ | données de Remaggi et al. [223], Ferretti et al. [72], adaptation de Weinbaum et al. [265] |
| Zhou et al. [286] | $3.79 \times 10^{-21}$ | adaptation de Weinbaum et al. [265] |
| Lemaire et al. [147] | $\{1 - 10\} \times 10^{-20}$ | données de You et al. [280], adaptation de Weinbaum et al. [265] |
| Anderson et al. [9] | $\{2.65 - 8.73\} \times 10^{-18}$ | données personnelles, modèle numérique multi-échelles |
| Goulet et al. [94] | $\{1.05 - 105\} \times 10^{-20}$ | modèle de Poiseuille modifié |
| Kameo et al. [121] | $\{3 - 10\} \times 10^{-19}$ | données personnelles, adaptation de Weinbaum et al. [265] |
| cette étude | $\{1 - 10\} \times 10^{-19}$ | MEF*, données anatomiques de You et al. [280] |
| Estimations expérimentales (couplées à des modèles poroélastiques) | | |
| Oyen [208] | $4.1 \times 10^{-24}$ | nanoindentation |
| Galli and Oyen [87] | $6.5 \times 10^{-23}$ | nanoindentation |
| Gailani et al. [85] | $\{1 - 10\} \times 10^{-25}$ | relaxation de contraintes sur des ostéons isolés |
| Gardinier et al. [88] | $2.8 \times 10^{-23}$ | rampe de chargement sur tissu osseux entier |

TABLE 2.1 – Estimations de la perméabilité intrinsèque lacuno-canaliculaire issues de la littérature. *MEF : méthode des éléments finis.

On peut alors remarquer qu'il existe un écart important entre les valeurs de $\kappa$ mesurées lors des récentes expérimentations et les estimations théoriques obtenues à partir de simulations numériques. Les deux plages de valeurs correspondantes ne se recouvrent d'ailleurs pas. Une telle différence, s'étalant sur plusieurs ordres de grandeur, ne peut être expliquée par les seules incertitudes inhérentes à tout protocole expérimental, ni par les incertitudes numériques classiques. Il convient alors de rechercher les points faibles des deux approches. Les modèles théoriques utilisés ici prennent peu en compte la présence de matrice péricellulaire au sein des canalicules, qui pourrait pourtant de modifier manière conséquente la morphologie de l'écoulement. Les récentes mesures expérimentales, quant à elles, conduisent à des valeurs étonnamment faibles de $\kappa$. Il serait donc intéressant de vérifier leur adéquation avec la morphologie du tissu osseux observée par imagerie.

C'est pourquoi, dans la suite de ce chapitre, nous chercherons dans un premier temps à discuter ces valeurs issues de la littérature à l'aide d'un outil utilisé originellement pour l'étude des sols, la loi de Kozeny-Carman, qui permet de relier la perméabilité intrinsèque à la taille de pores caractéristique du milieu étudié. En nous inspirant de cette loi, nous proposerons ensuite une relation semi-analytique entre la perméabilité $\kappa$ du tissu osseux et la structure microscopique des canalicules, obtenant ainsi une estimation théorique de $\kappa$ prenant en compte la présence de matrice péricellulaire. Nous proposerons également quelques pistes d'explication pour justifier l'écart important entre résultats expérimentaux et estimations théoriques de la perméabilité lacuno-canaliculaire osseuse. Enfin, nous verrons comment ces résultats pourraient être appliqués à l'amélioration des performances des bioréacteurs actuels lors des étapes de fin de culture *in vitro* des implants osseux.

## 2.1 Perméabilité intrinsèque et taille de pore

### 2.1.1 La loi de Kozeny-Carman

Joseph Kozeny, scientifique autrichien, propose en 1927 une loi permettant de relier la vitesse d'écoulement d'un fluide au sein d'un milieu poreux (vitesse de Darcy) aux caractéristiques géométriques de ce dernier, afin d'évaluer le comportement des sols saturés en eau. Il fait à l'époque l'hypothèse que les pores peuvent être assimilés à des tubes capillaires de même longueur, dans

lesquels s'écoule un fluide newtonien. Il obtient ainsi, *via* l'équation de Navier-Stokes, une estimation de la vitesse de Darcy dépendant des propriétés du fluide, du gradient de pression appliqué, de la porosité du milieu et d'un facteur géométrique variant selon la forme et la taille de la section droite des tubes capillaires [138]. Une dizaine d'année plus tard, Philip C. Carman modifie cette loi en considérant cette fois que les sols poreux peuvent être assimilés à des particules solides irrégulières autour desquelles s'écoule le fluide [36, 37].

Bien qu'initialement développées pour étudier le comportement des sols, ces lois ont ensuite été utilisées dans de nombreux domaines, et ont été écrites sous des formes variées, pour arriver à la loi de Kozeny-Carman utilisée aujourd'hui, qui permet de relier la perméabilité intrinsèque $\kappa$ d'un milieu isotrope à sa porosité $\eta_f$ selon :

$$\kappa = \frac{\eta_f^3}{c(1-\eta_f)^2 A^2} \tag{2.1}$$

où $c$ et $A$ sont respectivement le paramètre de Kozeny et la surface spécifique du milieu. Cette dernière correspond à l'aire de l'interface fluide-solide $A_{fs}$ par unité extensive du milieu poreux étudié – masse ou, comme considéré dans la suite de cette étude, volume $V$ – soit $A = A_{fs}/V$. Par ailleurs, $c$ peut être exprimé comme une fonction linéaire du carré de la tortuosité $\theta$, où $\theta$ correspond au ratio entre la longueur réelle $l$ (à l'échelle microscopique) parcourue par le fluide et la longueur macroscopique $L$ du milieu. On peut ainsi écrire

$$c = \alpha\theta^2 = \alpha\left(\frac{l}{L}\right)^2 \tag{2.2}$$

où la valeur du facteur de forme $\alpha$ est typiquement comprise entre 2 et 3 [66].

Cette relation semi-analytique s'appuie sur les théories fondées sur le rayon hydraulique, qui font l'hypothèse que le milieu poreux considéré est équivalent à un ensemble de tubes fins tortueux entourés de matrice solide. Ainsi, en associant une estimation numérique du flux de fluide aux observations expérimentales, on peut mettre en évidence une dépendance entre la perméabilité et la structure géométrique du réseau de pores. Dans cette approche, on suppose que le milieu est saturé en fluide, que les pores sont non occlus et que leur distribution au sein du matériau est uniforme en taille et en tortuosité. Enfin, cette relation n'est pas adaptée aux matériaux à forte

porosité [113].

Bien que cette loi présente de nombreuses limitations et nécessite la détermination expérimentale du paramètre $c$, l'équation de Kozeny-Carman est très largement utilisée pour estimer la perméabilité des milieux poreux. De plus, elle peut être simplifiée dans le cas de matériaux à faible porosité. En effet, en notant $\delta$ la taille caractéristique des pores et $V_f$ leur volume, on peut estimer $A$ et $\eta_f$ selon $A \equiv \delta^2/V$ et $\eta_f = V_f/V \equiv \delta^3/V$. On obtient ainsi, à partir de l'équation (2.1), l'approximation de la loi de Kozeny-Carman pour les matériaux à faible porosité (FP) :

$$\kappa = \frac{\eta_f \delta^2}{c(1-\eta_f)^2} \tag{2.3}$$

Une autre approximation classique utilisée dans l'étude des milieux poreux consiste à représenter le milieu poreux comme un ensemble de particules solides sphériques, le fluide s'écoulant dans les espaces restants entre ces sphères. En exprimant la surface spécifique en fonction du diamètre $d$ des sphères solides, la relation de Kozeny-Carman devient [177] :

$$\kappa = \frac{\eta_f^3 d^2}{k(1-\eta_f)^2} \tag{2.4}$$

où $k$ est le paramètre de Kozeny modifié. Cette équation peut s'écrire différemment, en exprimant la perméabilité en fonction de la taille de pore caractéristique $\delta$ au lieu du diamètre des sphères $d$. En notant $V_s$ le volume de la matrice solide et en remarquant que l'indice des vides $e = V_f/V_s = (V_f V)/(V V_s) = \eta_f/(1-\eta_f)$ peut être approché dans ce cas particulier par $\eta_f/(1-\eta_f) \equiv (\delta/d)^3$, on peut alors, en remplaçant $d$ par une fonction de $\delta$ et $\eta_f$, écrire la loi de Kozeny-Carman dans le cadre de l'approximation des sphères solides (SS) :

$$\kappa = \frac{\eta_f^{7/3} \delta^2}{k(1-\eta_f)^{4/3}} \tag{2.5}$$

Enfin, si on considère maintenant que le réseau lacuno-canaliculaire peut-être représenté de façon grossière par un ensemble de tubes capillaires orientés dans la direction radiale de l'ostéon, on peut introduire une troisième approximation classique de la loi de Kozeny-Carman. En schématisant le réseau de pores par des cylindres tortueux (de taille caractéristique $\delta$ et de tortuosité $\theta$) et en utilisant la loi de Poiseuille, on obtient l'approximation de la loi de Kozeny-Carman pour les cy-

lindres tortueux (CT), qui nous permet d'estimer la perméabilité dans la direction de l'écoulement [43] :

$$\kappa = \frac{\eta_f \delta^2}{32\theta^2} \tag{2.6}$$

Remarque : La taille caractéristique de pore $\delta$ ainsi définie correspond au ratio entre le volume fluide et la surface de l'interface fluide-solide, et est donc reliée au rayon hydraulique $R_H$ des pores considérés par un facteur de forme dépendant de la géométrie de ces derniers. En particulier, dans le cas de pores cylindriques (de rayon $R_p$), on a $\delta = R_p/2 = R_H$.

Dans ce paragraphe, nous avons donc introduit trois lois semi-analytiques permettant d'exprimer la perméabilité intrinsèque d'un réseau poreux en fonction des paramètres de texture de ce dernier, dont la porosité, la tortuosité, la surface spécifique, les paramètres de Kozeny et la taille caractéristique des pores. Ces lois correspondent à trois cas particuliers classiques utilisés dans l'étude des milieux poreux. Même si la morphologie du réseau lacuno-canaliculaire (tant en terme de porosité que de forme des pores) indique que les approximations (FP) et (CT) sont plus adaptées à l'étude de l'os cortical que l'approximation des sphères solides (SS), nous avons choisi de présenter également cette dernière pour pouvoir prendre en compte les résultats de l'étude de Goulet et al. [94], qui s'appuie sur une taille de particules, et non une taille de pores, pour déterminer la perméabilité $\kappa$.

### 2.1.2 Estimations correspondantes de la taille des pores lacuno-canaliculaires

D'après les études récentes disponibles dans la littérature, la porosité lacuno-canaliculaire $\eta_f$ de l'os cortical est comprise entre $1\%$ [35] et $12\%$ [94]. Nous considérerons donc ici que $\eta_f \approx 5\%$, ce qui correspond aux résultats des travaux de Cowin [49]. Sa tortuosité correspond quant à elle à celle des dendrites ostéocytaires, décrite par Marotti et al. [169], dont la valeur est estimée entre $2$ et $3$ [153, 120]. De plus, le paramètre de Kozeny $c$ apparaissant dans l'équation (2.1) peut être estimé en fixant la valeur du facteur de forme $\alpha$ à $2.5$ [177], et le paramètre analogue apparaissant dans l'équation (2.4) dans le cadre de l'approximation des sphères solides peut être calculé de manière exacte tel que $k = 72$ [177].

En s'appuyant sur ces valeurs, la figure 2.1 présente la variation de la perméabilité intrinsèque

en fonction de la taille caractéristique des pores pour les trois approximations classiques de la loi de Kozeny-Carman présentées au paragraphe précédent (faible porosité (FP), sphères solides (SS) et cylindres tortueux (CT)), d'après les équations (2.3), (2.5) et (2.6) respectivement. Deux rectangles correspondent ensuite aux plages de valeurs issues respectivement des expérimentations récentes (rectangle de gauche A) [208, 85, 88] et des études théoriques de l'écoulement fluide lacuno-canaliculaire (rectangle de droite B) (voir tableau 2.1). Deux lignes horizontales ont enfin été ajoutées comme repères représentant la taille d'une molécule d'eau ($3 \times 10^{-10}$ m, ligne en pointillés) et la taille minimale d'un pore nécessaire à la présence d'eau libre en son sein ($2 \times 10^{-9}$ m, ligne continue). Cette dernière valeur est déterminée à partir des estimations expérimentales de l'évolution de la distance inter-feuillets d'une argile lors de son gonflement cristallin [203]. En effet, lors de l'humidification d'une argile sèche, les premières molécules d'eau qui pénètrent entre les feuillets forment des couches d'eau adsorbée. Lorsque quatre couches sont formées, le processus de gonflement change à cause des phénomènes de pression osmotique, et de l'eau libre apparaît au sein des pores.

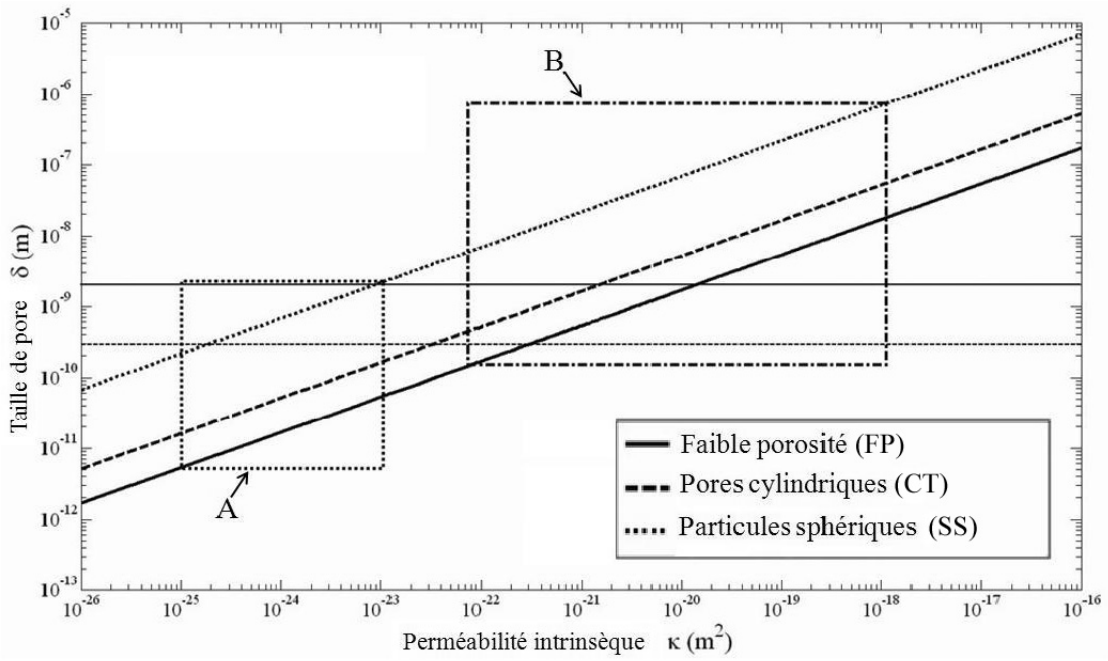



FIGURE 2.1 – Evolution de la taille des pores en fonction de la perméabilité pour les différentes approximations du modèle de Kozeny-Carman.

Pour une valeur donnée de la perméabilité, l'approximation des sphères solides (SS) donne

des estimations de taille de pore supérieures aux approximations de faible porosité (FP) et des cylindres tortueux (CT). Cela s'explique par le fait que cette approximation (SS) est mal adaptée aux milieux à faible porosité, puisque les géométries types auxquelles elle est associée ont des porosités généralement comprises entre $30\%$ et $50\%$ (sable humide par exemple). En utilisant cette approximation pour l'os cortical, on sous-estime donc, à géométrie fixée, la perméabilité lacuno-canaliculaire.

Malgré tout, quelle que soit l'approximation considérée, les données morphologiques de l'os associées aux mesures expérimentales récentes de $\kappa$ conduisent à des estimations de la taille caractéristiques de pore comprises entre $3 \times 10^{-12}$ et $2 \times 10^{-9}$ m, qui sont inférieures à la taille minimale nécessaire à la présence d'eau libre en leur sein. Comme nous l'avions suggéré au début de ce chapitre, ces mesures pourraient donc ne pas correspondre en l'état à la perméabilité lacuno-canaliculaire classique. Dans la section 2.3, nous proposerons des pistes d'explication de cet apparent paradoxe.

En revanche, l'ordre de grandeur des tailles caractéristiques de pore correspondant aux estimations théoriques de la perméabilité est globalement satisfaisant, à l'exception des modèles (FP) et (CT) pour les estimations les plus basses de $\kappa$. Plus précisément, si on considère que la taille caractéristique d'un canalicule est supérieure à la distance moyenne entre deux fibres péricellulaires (de l'ordre de quelques nanomètres [280]) et inférieure au rayon moyen d'un canalicule (soit environ 0.1 $\mu$m [49]), les modèles (FP) et (CT) donnent une plage de valeurs pour la perméabilité intrinsèque allant de $10^{-18}$ à $10^{-20}$ m$^2$, située dans la moitié haute des valeurs issues de la littérature. Néanmoins, un biais important de ces méthodes d'estimation provient de la présence d'une matrice péricellulaire fibreuse au sein des canalicules, qui n'y est que très peu prise en compte. C'est à cet aspect que nous allons maintenant nous intéresser, en proposant une relation semi-analytique entre la perméabilité intrinsèque lacuno-canaliculaire $\kappa$ et la structure microscopique des pores canaliculaires.

## 2.2 Perméabilité intrinsèque et structure géométrique des pores

Même si les modèles théoriques semblent être des méthodes efficaces pour déterminer la perméabilité lacuno-canaliculaire $\kappa$ de l'os cortical, ils s'appuient sur des hypothèses plutôt restric-

tives et parfois peu fidèles au milieu réel, en particulier en ce qui concerne la morphologie du réseau lacuno-canaliculaire. Ainsi, dans l'étude de Lemaire et al. [145], les pores sont représentés par des anneaux vides (tenant ainsi compte de la présence de la dendrite ostéocytaire mais négligeant la présence de matrice extracellulaire) pour s'intéresser aux phénomènes électrocinétiques présents au sein des pores. Une représentation plus réaliste de ces derniers, initialement proposée par Weinbaum et al. [265], prend en compte la présence des fibres péricellulaires qui occupent partiellement l'espace annulaire entre l'ostéocyte et la paroi du canalicule à l'aide d'un raisonnement en deux étapes. Dans un premier temps, une perméabilité locale, à l'échelle d'un pore, est calculée pour un canal rempli de fibres en simulant un écoulement de Poiseuille au sein du canalicule, prenant ainsi en compte l'influence des fibres péricellulaires. Puis, dans un second temps, cette perméabilité locale est ramenée à l'échelle du réseau lacuno-canaliculaire à l'aide d'un paramètre textural macroscopique (la densité surfacique de canalicules). Cette méthode à deux niveaux a ensuite été utilisée et adaptée dans plusieurs études [100, 15, 148]. Chez Goulet et al. [94], par exemple, un facteur $100$ a été ajouté au dénominateur du modèle de perméabilité canaliculaire pour tenir compte, même grossièrement, de la présence de la matrice péricellulaire. Dans l'étude de Anderson et al. [9], il a été choisi de représenter l'influence de cette dernière en modifiant la nature du matériau modélisé au sein des canalicules.

### 2.2.1 Méthode

Pour évaluer au mieux la perméabilité lacuno-canaliculaire de l'os cortical, il serait intéressant d'obtenir une loi de type Kozeny-Carman qui permettrait d'exprimer $\kappa$ en fonction de paramètres texturaux macroscopiques (porosité, tortuosité) d'une part, et faisant apparaître un diamètre caractéristique de pore d'autre part, qui refléterait la structure géométrique des canalicules à la petite échelle. Cette taille de pore devrait alors tenir compte des impacts sur la perméabilité des rayons respectifs du canalicule et de la dendrite ostéocytaire, et des paramètres géométriques des fibres péricellulaires (rayon, orientation, distance fibre à fibre, densité de fibres).

L'une des difficultés principales dans ce type de détermination multi-échelle réside dans la codépendance entre les paramètres géométriques microscopiques et les paramètres texturaux macroscopiques tels que la porosité et la tortuosité. Malheureusement, il n'existe à notre connaissance

aucune donnée dans la littérature portant sur cette dépendance. En effet, les différentes études anatomiques menées sur le tissu osseux se concentrent soit sur la structure nanométrique des pores, à partir d'images obtenues à l'échelle d'un canalicule, soit sur les paramètres macroscopiques mesurables à l'échelle de l'ostéon. Les liens entre ces deux échelles restent encore à construire.

Par ailleurs, déterminer avec précision la porosité et la tortuosité du tissu osseux s'avère être une entreprise complexe. En raison des difficultés expérimentales, les différentes études menées pour mesurer $\eta_f$ conduisent ainsi à des valeurs s'étalant sur un ordre de grandeur – de $2.3$ [83] à $20\%$ [121], même si une plage communément admise de variations est comprise entre $2.3$ et $5\%$ [49]. La tortuosité morphologique du réseau lacuno-canaliculaire, même si elle n'a pas encore été directement quantifiée, a quant à elle été décrite de manière qualitative [169] et même reliée à certaines pathologies osseuses [131]. Néanmoins, il n'existe à l'heure actuelle aucune quantification de ce paramètre prenant en compte le caractère non rectiligne des pores lacuno-canaliculaires. Il est en revanche raisonnable de penser qu'il est du même ordre de grandeur que les tortuosités classiques d'autres matériaux poreux, soit $\theta \leq 3$ [153].

C'est pourquoi, dans le cadre de cette étude, nous considérerons qu'à l'échelle du tissu osseux, la porosité et la tortuosité sont indépendantes de la structure nanométrique des pores, et dépendent uniquement de paramètres géométriques eux aussi macroscopiques (densité des canalicules et des lacunes au sein du tissu, taille des corps cellulaires des ostéocytes, bifurcations canaliculaires). Bien que restrictive, cette hypothèse peut se justifier pour la porosité corticale en remarquant que la plage de variations de cette dernière disponible dans la littérature a été obtenue en utilisant des échantillons différents, et donc des structures nanométriques différentes. Les variations de porosité dues à cette structure sont donc inférieures à un ordre de grandeur, ce qui les rend négligeables devant l'étendue de la plage d'estimations de $\kappa$ disponible dans la littérature. Les autres hypothèses réalisées dans le cadre de ce travail correspondent aux hypothèses classiques des théories s'appuyant sur le rayon hydraulique. On suppose ainsi que le milieu est saturé en fluide, et que l'équation de Stokes est adaptée pour décrire l'écoulement au sein des pores, ces derniers étant non occlus et distribués uniformément en taille et en tortuosité au sein du matériau.

Dans ces conditions, il est possible d'utiliser la méthode de Weinbaum et al. [265] et de déterminer la perméabilité lacuno-canaliculaire en deux étapes : à l'échelle de l'espace péricellulaire au sein des pores pour commencer, à l'aide de la méthode des éléments finis, puis à l'échelle du

réseau lacuno-canaliculaire.

Notre stratégie consiste donc à conduire dans un premier temps des simulations numériques pour évaluer la vitesse du fluide interstitiel dans une représentation idéalisée d'un pore canaliculaire, afin d'en déduire la conductivité de Hagen-Poiseuille qui lui est associée. En faisant varier différents paramètres géométriques du canalicule, de l'ostéocyte et des fibres péricellulaires, il est alors possible de relier quantitativement cette conductivité à une taille de pore effective regroupant tous ces paramètres. Nous avons donc construit plusieurs géométries de pores canaliculaires en nous appuyant sur les observations anatomiques de You et al. [280]. Les structures canaliculaires modélisées étant fortement idéalisées, nous supposerons dans la suite de ce chapitre que les irrégularités des parois canaliculaires mises en évidence par les études anatomiques récentes [236, 239, 157] sont prises en compte dans la tortuosité macroscopique du réseau lacuno-canaliculaire. A partir de ces simulations, on peut ensuite déterminer la perméabilité lacuno-canaliculaire – à l'échelle du tissu – en moyennant cette conductivité de Hagen-Poiseuille sur un volume représentatif d'os entourant le canalicule, faisant ainsi intervenir la porosité et la tortuosité.

On obtient ainsi une loi de type Kozeny-Carman pour la perméabilité $\kappa$ combinant les influences des paramètres macroscopiques et de la microstructure à l'échelle du pore. Cette estimation à deux niveaux de la perméabilité serait un bon outil pour décrire l'évolution des phénomènes d'écoulement au sein de l'os au cours de temps. En effet, il serait utile de pouvoir séparer les effets d'événements microscopiques de ceux d'événements macroscopiques lors de l'étude de l'activité osseuse. La densité de fibres péricellulaires par exemple, qui est un paramètre intrinsèquement microscopique, a un effet prouvé sur la signalisation cellulaire du remodelage osseux [222]. Par ailleurs, un changement de porosité ou l'apparition de fissures, qui concernent des paramètres macroscopiques (à l'échelle du tissu) participent eux aussi, bien que d'origine différente, au processus de remodelage osseux [32, 172, 200].

### 2.2.2 Ecoulement du fluide au sein d'un pore

Pour pouvoir étudier l'influence des différents paramètres géométriques sur l'écoulement du fluide interstitiel au sein d'un pore lacuno-canaliculaire, il convient de définir une géométrie sim-

plifiée de ce pore, qui pourra être modifiée au gré des configurations géométriques. Pour cela, remarquons tout d'abord que l'écoulement du fluide dans l'environnement cellulaire est gouverné par les phénomènes apparaissant dans les porosités les plus fines. La structure clé à étudier est donc le canalicule, la présence des lacunes pouvant elle être négligée. Notre simulation numérique porte ainsi sur un canal rectiligne annulaire, situé entre la paroi du canalicule (de rayon $R_C$) et celle de la dendrite de l'ostéocyte (de rayon $R_O$), et partiellement occupé par des fibres péricellulaires (de rayon $R_F$, voir figure 2.2). D'après l'étude de You et al. [280], on peut considérer que ces dernières sont disposées périodiquement dans le canal, tant dans la direction longitudinale (distance fibre à fibre $D_{LF}$) que transversale (nombre de fibres par section tranverse $N_F$).

Compte tenu des périodicités de cette géométrie idéalisée, seule une fraction du canal est modélisée afin de réduire les coûts de calcul. Comme indiqué sur la figure 2.2, le volume étudié correspond donc à une portion angulaire du canal annulaire, et contient des plans de fibres régulièrement espacés d'une distance $D_{LF}$ dans la direction longitudinale. La périodicité angulaire est elle déterminée par le rapport $2\pi/N_F$.

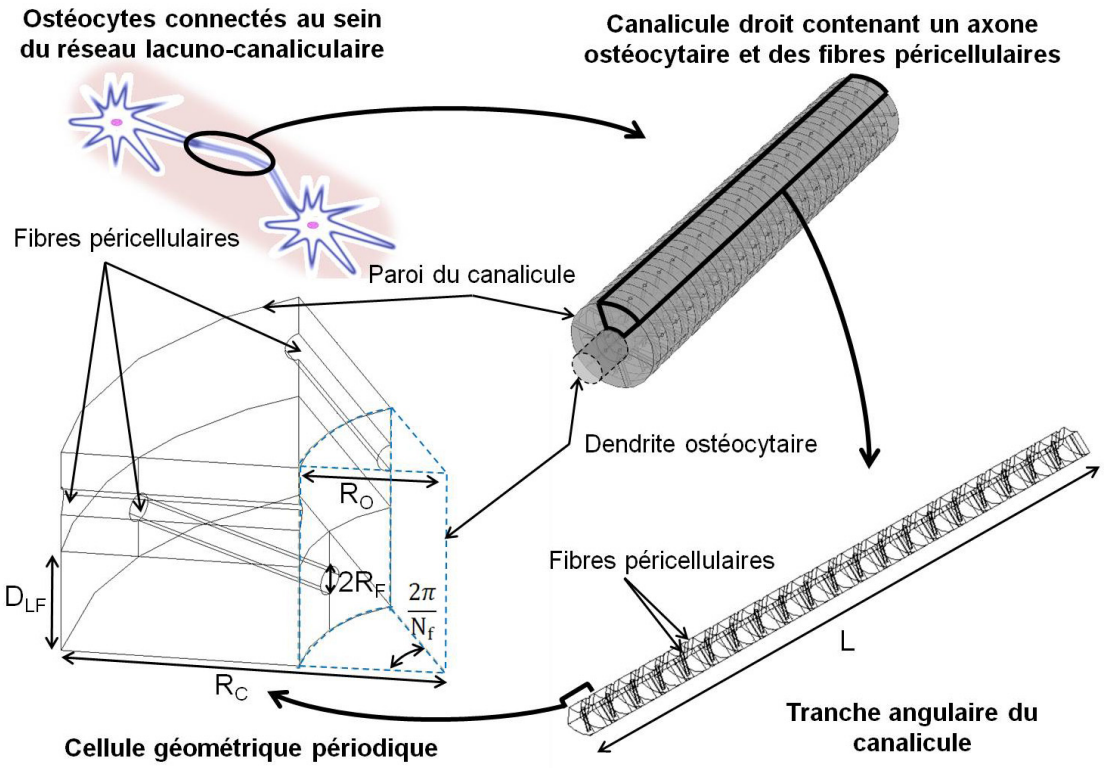



FIGURE 2.2 – Géométrie du pore modélisé. $R_C$ : rayon du canalicule, $R_O$ : rayon de la dendrite ostéocytaire, $R_F$ : rayon des fibres péricellulaires, $D_{LF}$ : distance longitudinale entre deux plans de fibres, $N_F$ : nombre de fibres par section transverse.

On considère ensuite un fluide aqueux, de densité $\rho_f = 1000$ kg.m$^{-3}$ et de viscosité dynamique $\mu_f = 6 \times 10^{-4}$ Pa.s, saturant les pores canaliculaires. Le nombre de Reynolds associé à ce système étant très faible, l'écoulement du fluide peut ici être modélisé à l'aide de l'équation de Stokes pour un fluide incompressible. Précisons que sous les conditions usuelles de pression et de température, l'équation de Navier-Stokes reste valable pour étudier l'écoulement de l'eau dans un canal jusqu'à un diamètre d'un à deux nanomètres [18], et peut donc être utilisée pour cette étude.

En entrée et en sortie du canal, on impose des conditions aux limites en pression telles que la différence de pression totale le long du canal soit de $\Delta P = 41$ Pa. Nous nous sommes par ailleurs assurés que la longueur du canal modélisé ($L = 41 D_{LF}$) soit suffisante pour éviter tout effet de bord au milieu de celui-ci. Ainsi, en se référant aux données rassemblées dans le tableau 2.2, le gradient hydraulique considéré correspond à celui utilisé par Anderson et al. [8] pour simuler les conditions d'écoulement *in vivo*. Enfin, la résolution numérique de ce problème a été réalisée en régime stationnaire à l'aide du logiciel COMSOL Multiphysics®, en utilisant une méthode de Newton avec coefficient d'amortissement, et des éléments tétraédriques associés à des fonctions d'interpolations linéaires. Dans le cas de la géométrie de référence (*i.e.* pour laquelle tous les paramètres sont maintenus à leur valeur de référence), on obtient donc un système à $750000$ degrés de liberté environ, contenant près $155000$ tétraèdres.

A partir de l'écoulement ainsi simulé, il est possible d'évaluer le champ de vitesse du fluide au sein du pore, puis de le moyenner sur une section transverse prise au milieu du canal pour estimer la vitesse moyenne d'écoulement $V_{pore}$. La conductivité locale de Hagen-Poiseuille $\kappa_{HP}$ dans la direction longitudinale du pore, qui se déduit de la loi de Poiseuille, peut alors être estimée avec une précision de $2\%$ pour une nanostructure donnée selon

$$\kappa_{HP} = \frac{V_{pore} L \mu_f}{\Delta P} \tag{2.7}$$

### 2.2.3 Conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ et structure géométrique des pores

Pour évaluer l'influence des différents paramètres géométriques associés à la nanostructure des pores sur la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$, nous les avons fait varier un à un en parcourant les plages de valeurs décrites par You et al. [280] (tableau 2.2, données Y), les autres étant maintenus

à leurs valeurs de référence (en gras dans le tableau), qui correspondent aux valeurs moyennes proposées par You et al. [280]. D'autres estimations des propriétés géométriques des pores canaliculaires sont proposées dans l'étude de Weinbaum et al. [265], et sont également présentées dans le tableau 2.2 pour comparaison (données W). Dans ces travaux, la matrice péricellulaire est supposée être isotrope, et est caractérisée par une distance fibre à fibre $\Delta$. Pour pouvoir confronter ultérieurement nos résultats à ceux de cette étude, cette dernière a été reliée au paramètre $N_F$ prenant comme distance caractéristique la distance transverse entre deux fibres situées sur le même plan transverse au milieu de l'espace annulaire constituant le canal (voir tableau 2.2).

| Paramètres | Données Y [280] | Données W [265] |
|---|---|---|
| $R_C$ | $\{7-8-9-10-11-12-\mathbf{13}-14-15\}\times10^{-8}$ m | $20\times10^{-8}$ m |
| $R_O$ | $\{35-40-45-\mathbf{50}-55-60-65-70-75-80\}\times10^{-9}$ m | $10\times10^{-8}$ m |
| $R_F$ | $\{3-4-\mathbf{5}-6-7-8\}\times10^{-9}$ m | $6\times10^{-10}$ m |
| $D_{LF}$ | $\{25-30-35-\mathbf{38}-45\}\times10^{-9}$ m | $\Delta$ |
| $N_F$ | $\{2-3-4-\mathbf{6}-8-12-15-16-18-30\}$ | $\pi(R_C+R_O)/\Delta$ |
| $\Delta$ | $\pi(R_C+R_O)/N_F$ | $7\times10^{-9}$ m |
| $\mu_f$ | $0.6\times10^{-3}$ Pa.s | |

TABLE 2.2 – Paramètres géométriques des pores étudiés, d'après l'étude anatomique de You et al. [280] (données Y) et les estimations de Weinbaum et al. [265] (données W). Les valeurs en gras correspondent à la valeur de référence de chaque paramètre.

Chaque configuration géométrique utilisée pour notre simulation numérique est ensuite caractérisée par un unique paramètre scalaire, la taille caractéristique de pore $\delta$, définie en fonction de la porosité $\eta_f$ et de la surface spécifique $A$ du volume élémentaire représentatif :

$$\delta \equiv \frac{\eta_f}{A} = \frac{V_f}{V}\frac{V}{A_{fs}} = \frac{V_f}{A_{fs}} = \frac{D_{LF}(R_C^2-R_O^2)-N_F R_F^2(R_C-R_O)}{2D_{LF}(R_C+R_O)+2N_F R_F(R_C-R_O)-2N_F R_F^2} \tag{2.8}$$

Sur la figure 2.3, nous avons tracé l'évolution de $\kappa_{HP}$ en fonction de $\delta$. Pour plus de lisibilité, nous avons également ajouté une interpolation des résultats obtenus (de coefficient de détermination $R^2$) par une loi puissance pour vérifier la dépendance en $\delta^2$ de la loi de Kozeny-Carman. On retrouve alors le comportement parabolique observé expérimentalement par Kozeny et Carman [36, 37] :

$$\kappa_{HP} = 0.42\,\delta^{2.04} \tag{2.9}$$

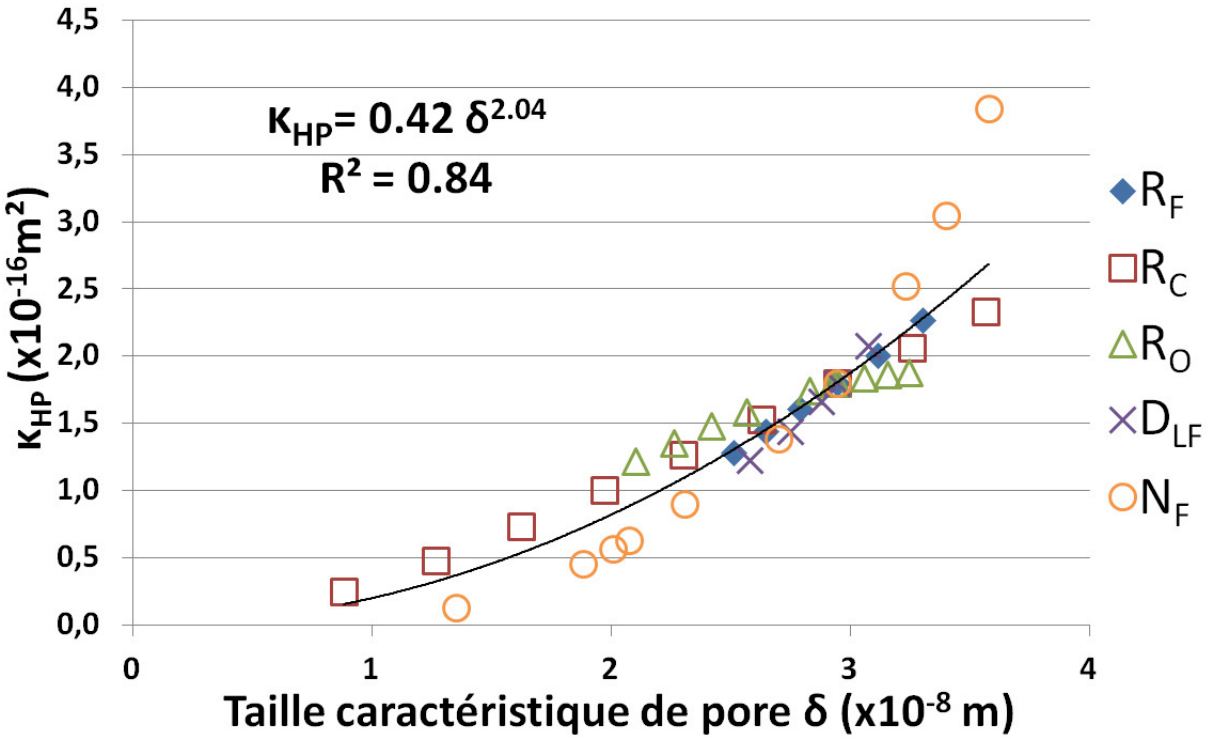



FIGURE 2.3 – Evolution de la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ en fonction de la taille caractéristique de pores $\delta$

L'équation 2.9 nous permet de quantifier l'impact de la nanostructure sur l'écoulement du fluide interstitiel au sein d'un canalicule droit. Il nous reste maintenant à évaluer les conséquences de cette variation au niveau du réseau lacuno-canaliculaire.

### 2.2.4 Détermination de la perméabilité intrinsèque lacuno-canaliculaire $\kappa$

La perméabilité intrinsèque d'un milieu poreux s'obtient en moyennant le champ de vitesse $\vec{v}$ sur le volume $V$ du milieu considéré. Dans notre cas, on peut alors, en notant $L$ la longueur macroscopique de l'échantillon, écrire la loi de Darcy :

$$V_D = \frac{1}{V}\left\| \int_V \vec{v} dV \right\| = \frac{\kappa}{\mu_f}\frac{\Delta P}{L} \tag{2.10}$$

où $\kappa$ désigne la perméabilité intrinsèque lacuno-canaliculaire. De plus, passer de la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ à la perméabilité $\kappa$ implique le passage d'un canalicule droit à un réseau de canalicules tortueux. Rappelons que par hypothèse, l'impact du caractère non rectiligne des canalicules sur $\kappa$ est pris en compte *via* la tortuosité macroscopique du réseau lacuno-canaliculaire $\theta$. On a

ainsi

$$\eta_f = \frac{V_f}{V} = \frac{S_f l}{SL} = \frac{S_f}{S}\theta \tag{2.11}$$

où $S_f$ est l'aire de la surface de fluide contenue dans une section droite de l'échantillon (et supposée constante le long de celui-ci), $l$ est la longueur réelle des canalicules, et $S$ est l'aire de la section droite de l'échantillon.

Le flux du fluide étant conservatif, on peut, en utilisant les équations (2.7), (2.10) et (2.11), exprimer la perméabilité $\kappa$ en fonction de la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ et des paramètres macroscopiques $\eta_f$ et $\theta$ selon :

$$\kappa = \frac{\eta_f \kappa_{HP}}{\theta^2} = 0.42\frac{\eta_f \delta^{2.04}}{\theta^2} \equiv 0.42\frac{\eta_f \delta^2}{\theta^2} \tag{2.12}$$

Remarque : Les équations (2.7), (2.10) et (2.11) permettent également de relier les vitesses $V_{pore}$ et $V_D$ selon

$$V_D = \frac{\eta_f}{\theta^2} V_{pore} \tag{2.13}$$

La relation (2.12) est cohérente avec les résultats typiques des études théoriques de la perméabilité fondées sur le rayon hydraulique. $\kappa$ est en effet ici proportionnel au carré de la taille caractéristique des pores, ce qui est conforme aux travaux de Frenkel [80].

De plus, cette loi pourrait aisément être adaptée pour prendre en compte l'anisotropie morphologique du réseau lacuno-canaliculaire, connue pour modifier l'écoulement macroscopique du fluide [121]. Il suffirait pour cela d'introduire une dépendance directionnelle de la tortuosité ou un facteur macroscopique d'orientation, comme proposé par Sullivan [247], lors du passage de $\kappa_{HP}$ à $\kappa$.

## 2.3 Discussion

### 2.3.1 Analyse des estimations de $\kappa$ issues de notre étude numérique

Dans le cadre de cette étude, nous avons défini une loi semi-analytique (équation (2.12)) reliant la perméabilité intrinsèque du réseau lacuno-canaliculaire à une taille de pores caractéristique pre-

nant en compte les variations éventuelles de la structure microscopique des pores canaliculaires. Il est ainsi possible d'évaluer l'impact d'une modification de cette structure sur l'écoulement du fluide observé macroscopiquement.

En considérant une porosité $\eta_f \equiv 2 - 5\%$ [49], une tortuosité $\theta \equiv 3$ [153] et une taille de pores physiologique $\delta$ issue des données de You et al. [280], la perméabilité lacuno-canaliculaire estimée selon la méthode présentée dans ce chapitre est de l'ordre de $(1 - 10) \times 10^{-19}$ m$^2$. Elle se situe donc dans la fourchette haute des estimations théoriques issues de la littérature, et est bien au-dessus des mesures expérimentales récentes (voir tableau 2.1).

De plus, la forte dépendance de $\kappa_{HP}$, et donc de $\kappa$, vis-à-vis de la taille caractéristique de pore $\delta$, visible sur la figure 2.3, montre que les phénomènes d'écoulement fluide ayant lieu au sein du tissu osseux cortical sont en réalité bien régis par la structure microscopique des pores. Tous les paramètres géométriques étudiés ici ont d'ailleurs une influence statistiquement significative sur la perméabilité $\kappa$ (voir annexe A). Sur ce graphe, on peut tout d'abord remarquer que bien que les points correspondant à l'évolution du rayon des fibres $R_F$ soient les plus proches de la courbe interpolante, les paramètres géométriques les plus influents semblent être le rayon du canalicule $R_C$ et le nombre de fibres par section transverse $N_F$. En effet, leurs variations sont à l'origine des variations les plus importantes de la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$. Néanmoins, pour analyser plus précisément la nature de ces dépendances, il est important de distinguer les deux aspects de la structure microscopique des pores inclus dans $\delta$ : la taille du canal d'une part, contrôlée par les rayons $R_O$ et $R_C$, et la présence des fibres d'autre part.

Ainsi, pour un milieu poreux comportant un nombre négligeable de fibres ($N_f \longrightarrow 0$), l'équation (2.8) devient $\delta \sim R_C - R_O$. C'est donc la distance $R_C - R_O$, et non le rayon $R_C$ seul, qui joue un rôle important sur l'évolution de $\kappa_{HP}$. L'apparente domination de $R_C$ sur $R_O$ dans nos résultats est en fait principalement due aux plages de valeurs physiologiques considérées pour ces deux paramètres. Cette asymétrie des rôles entre $R_C$ et $R_O$ se retrouve par contre dans le cas où le rayon du canalicule est très grand devant celui de l'ostéocyte, puisque dans ce cas, $(R_C - R_O) \sim R_C$.

Par ailleurs, pour une valeur fixe de $R_C$ et $R_O$, et donc une taille de canal donnée, l'impact de la présence des fibres péricellulaires sur $\kappa_{HP}$ semble être principalement contrôlé par le nombre de fibres par section transverse $N_F$. Ce résultat est cohérent avec les travaux de Weinbaum et al. [265], qui sont une référence dans la représentation théorique des écoulements fluides lacuno-

canaliculaires. Ces derniers consistent en la proposition de deux approximations numériques de la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$. La première, appelée la "constante de perméabilité à la petite échelle" (modèle T-W), a été développée par Tsay and Weinbaum [253] pour étudier un écoulement visqueux au sein d'un pore plan périodiquement traversé par des fibres transverses. Dans ce modèle, les paramètres structuraux considérés sont le rayon des fibres $R_F$ et la distance fibre à fibre $\Delta$. Il faut néanmoins noter que ce modèle fait l'hypothèse d'un réseau de fibres isotrope, alors que les données de You et al. [280] laissent à penser que les distributions longitudinale et transversale des fibres au sein du canalicule sont différentes. La seconde approximation, présentée dans Weinbaum et al. [265], modifie cette première estimation de $\kappa_{HP}$ pour prendre en compte la forme annulaire du pore, et ainsi obtenir un paramètre d'écoulement appelé "constante de perméabilité à la petite échelle effective" (modèle W). En raison du manque de données descriptives sur la nanostructure osseuse disponibles à l'époque, les auteurs de ces travaux ont proposé une liste d'échelles de longueur plausibles pour les différents éléments structuraux du canalicule, qui sont ici rappelés dans le tableau 2.2 (données W).

La figure 2.4 propose une comparaison entre les résultats de notre étude et ceux obtenus avec les modèles W et T-W à partir des données anatomiques de You et al. [280] (données Y). La distance fibre à fibre $\Delta$ apparaissant dans les deux derniers modèles a été considérée ici comme étant la distance entre deux fibres de la même section transverse au milieu de l'espace annulaire formant le canal (*i.e.* pour $R = (R_C + R_O)/2$, voir tableau 2.2). La loi parabolique obtenue sur la figure 2.3 a également été rappelée pour plus de lisibilité. Il apparaît alors que nos résultats sont en moyenne un ordre de grandeur en dessous de ceux issus des deux autres modèles, et ce bien que le modèle W prenne en compte la présence des parois du pore.

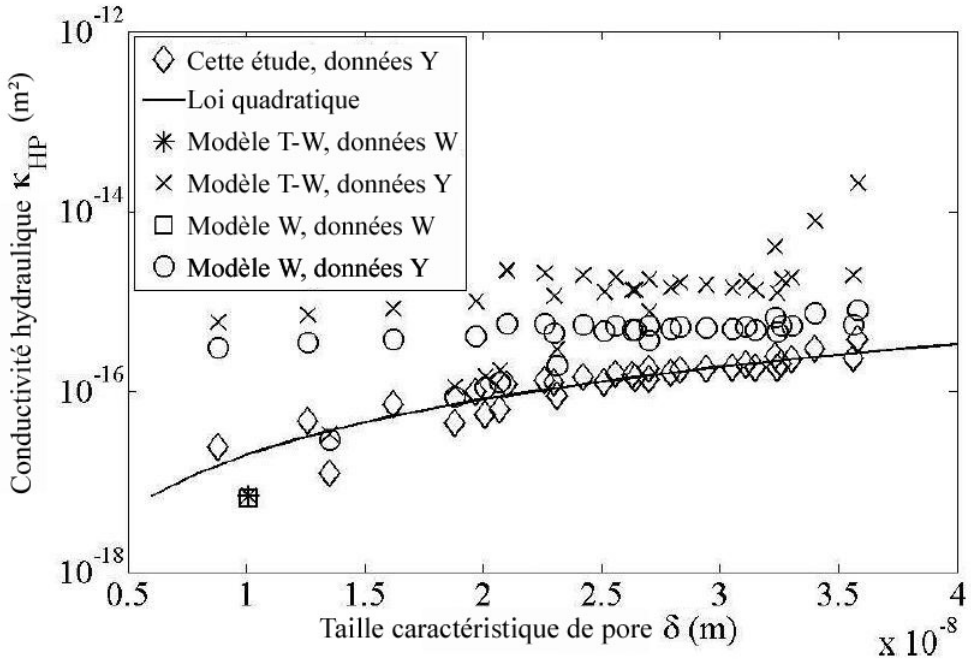



FIGURE 2.4 – Comparaison des résultats fournis par notre approche avec ceux issus des modèles de Tsay and Weinbaum [253] (modèle T-W) et de Weinbaum et al. [265] (modèle W) à partir des données de You et al. [280] (données Y). Les résultats des modèles W et T-W obtenus à partir des données de l'époque (données W, Weinbaum et al. [265]) sont également représentés.

Nous avons ensuite ajouté deux points correspondant aux estimations obtenues par les modèles W et T-W avec les données de l'époque (données W). Nous avons pour cela estimé la taille de pore $\delta$ correspondante en déduisant le nombre de fibres transverses $N_F$ de la distance fibre à fibre $\Delta$ utilisée dans les modèles initiaux (voir tableau 2.2). Les deux estimations de la conductivité hydraulique ainsi obtenues sont très proches des valeurs les plus basses de $\kappa_{HP}$ issues de notre étude. En revanche, elles sont un à deux ordres de grandeur en-dessous des estimations données par ces mêmes modèles à partir des données de You et al. [280]. Cet écart peut s'expliquer par la grande différence existant entre les données Y et les données W de l'époque, ces dernières correspondant à un réseau de fibres beaucoup plus dense, mais composé de fibres plus minces.

### 2.3.2 Limites de cette approche numérique

Comme nous l'avions indiqué au paragraphe 2.2.1, l'hypothèse la plus forte réalisée dans le cadre de cette étude consiste à négliger la codépendance entre la porosité et la microstructure des pores. Malheureusement, le manque actuel de données sur cette corrélation nous contraint à traiter

l'influence de ces deux paramètres séparément. De plus, nous avons supposé que les conditions d'utilisation des théories sur le rayon hydraulique, telles que la distribution volumique uniforme de la tortuosité et la non-occlusion des pores, sont satisfaites [35]. Ces deux points mériteraient d'être discutés plus avant. Pour prendre en compte l'existence de pores occlus, Anderson et al. [9] propose par exemple un post-traitement utilisant les réseaux de neurones. Plus généralement, cette étude devrait être complétée par une étude statistique complète portant sur un panel de données anatomiques plus large que celui actuellement considéré.

Une seconde hypothèse forte réalisée dans le cadre de ce modèle concerne l'incompressibilité du fluide et la condition de non-glissement imposée à l'interface fluide-solide. Des travaux récents réalisés sur les tissus artériels [4, 248, 125] pourraient être adaptés au tissu osseux pour améliorer ce point.

Enfin, même si elle reste utilisable jusqu'à une taille de pore de $1 - 2$ nm, l'équation de Stokes devrait être modifiée pour prendre en compte les effets électriques induits par la charge surfacique des parois des pores [151]. Nous reviendrons sur ce point au paragraphe 2.3.4.

### 2.3.3 Limites possibles des méthodes expérimentales actuelles

Nous avions vu au paragraphe 2.1.2 que les tailles de pores issues des estimations expérimentales récentes de la perméabilité $\kappa$ étaient trop faibles pour correspondre à la morphologie du tissu osseux cortical. En effet, une analyse dimensionnelle réalisée à partir de la forme générale de la loi de Kozeny-Carman nous indique que cette perméabilité ne peut être inférieure à une valeur se situant trois ou quatre ordres de grandeur en dessous du carré de la taille caractéristique de pores. Ainsi, en s'appuyant sur les données anatomiques disponibles, la valeur minimum des estimations théoriques de $\kappa$ serait de $10^{-22}$ m$^2$.

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons donc aux possibles sources de biais expérimentaux liés aux protocoles récents utilisés dans la littérature, et qui pourraient expliquer l'obtention de ces valeurs étonnamment basses de $\kappa$.

Tout d'abord, remarquons que dans ces nouveaux protocoles, la perméabilité est extrapolée à partir d'un test mécanique couplé à un modèle poroélastique. Ainsi, les études de Oyen [208] et de Galli and Oyen [87] couplent nanoindentation et analyse poroélastique, les travaux de Gailani et al.

[85] consistent à soumettre un ostéon à une rampe de chargement avant de comparer les courbes expérimentales obtenues à des courbes théoriques de relaxation de contraintes, et Gardinier et al. [88] impose un palier de compression à un échantillon de tissu osseux intact. Toutes ces méthodes dépendent donc fortement de la pertinence des modèles poroélastiques mis en jeu, qui inclut : les hypothèses sur lesquelles ils sont construits – telles qu'une symétrie axiale, une géométrie périodique, un milieu isotrope transverse et l'incompressibilité ou non du fluide considéré –, la pertinence des conditions aux limites choisies et la précision des paramètres poroélastiques, qui proviennent souvent de la littérature.

A cela s'ajoute les incertitudes classiques inhérentes à tout procédé expérimental. Ainsi, le choix et le prélèvement de l'échantillon osseux sont des étapes délicates, durant lesquelles le dessèchement de l'échantillon doit être minimisé pour s'assurer de la qualité de la mesure. De même, le nettoyage préalable ou non de la matière organique initialement contenue dans l'échantillon peut influencer les mesures finales. En particulier, la présence de vénules et d'artérioles au sein des canaux de Havers a tendance à augmenter la résistance hydraulique de l'échantillon, faisant ainsi décroître la perméabilité mesurée. De manière similaire, la poussière d'os dégagée lors de l'extraction du spécimen peut boucher une partie des pores et ainsi augmenter la résistance hydraulique apparente. D'un autre côté, certains traitements chimiques (collagénase, acétone, méthanol) augmentent grandement la perméabilité, comme le montre l'étude de Wen et al. [266]. Notons également que le fluide utilisé pour réaliser la perfusion ne possède pas toujours la même rhéologie que les fluides physiologiques.

Enfin, la sollicitation mécanique imposée au système pourrait elle-même avoir des effets indésirables. La configuration de l'échantillon osseux est en effet susceptible de changer une fois celui-ci placé dans la cellule de chargement en fonction de sa forme, de la relative irrégularité – et donc de la rugosité – de sa surface, de son orientation, des bouchages éventuels de ses pores, etc.

Les causes empiriques possibles des écarts constatés entre mesures expérimentales et estimations théoriques de la perméabilité sont donc multiples. Néanmoins, elles ne peuvent en constituer la seule explication. En revanche, un autre biais, commun aux techniques expérimentales et aux approches théoriques, pourrait venir du fait que les pores lacuno-canaliculaires sont suffisamment minces pour observer des effets couplés électrochimiques. Or ces derniers sont rarement pris en compte lors de la détermination de $\kappa$. C'est donc à cette question que nous allons à présent nous

intéresser.

### 2.3.4 Phénomènes électrochimiques au sein de l'os cortical

D'un point de vue électrochimique, la circulation lacuno-canaliculaire du fluide interstitiel est caractérisée par l'écoulement d'une solution électrolytique au sein d'une matrice solide chargée. En effet, le fluide interstitiel est une solution aqueuse contenant des ions issus de la dissolution de sels minéraux (calcium et phosphate entre autres). De plus, comme la plupart des tissus biologiques, la matrice osseuse corticale et la membrane ostéocytaire présentent une charge négative $\sigma_{elec}$ à sa surface, due aux fibres de collagène qu'elle contient pour la première [179], et aux acides gras qui la composent pour la seconde [62]. Pour compenser cette charge négative, le fluide situé au voisinage de l'interface fluide-solide contient donc des cations en excès, dont une partie est adsorbée à la paroi, formant une couche ionique communément appelée la couche immobile de Stern. Mais la majorité de ces charges positives est située dans un électrolyte aqueux situé au voisinage de la surface, formant une couche diffuse composée de charges mobiles. Ces deux couches, associées aux charges fixes de la matrice solide, forment ce qu'on appelle la double couche électrique [112, 151].

Lorsqu'elle est mise en mouvement par l'écoulement du fluide interstitiel dû au gradient de pression, la population de charges de cette double couche génère des courants d'écoulement observables macroscopiquement, auxquels correspond un potentiel d'écoulement concomitant [150]. Le gradient de ce potentiel génère ensuite un mouvement électrophorétique des charges mobiles, opposé au courant d'écoulement. En raison des forces d'interactions visqueuses, les ions ainsi déplacés entraînent alors le fluide avoisinant avec eux, faisant ainsi apparaître un écoulement secondaire s'opposant à l'écoulement initial généré par le gradient de pression : c'est le phénomène d'électro-osmose. La présence de cet écoulement électro-osmotique limite la perméabilité apparente du réseau poreux [3], et oblige à adapter le modèle de Biot et la loi de Darcy [191, 149, 150]. De plus, pour des tailles de pores très faibles, les couches ioniques situées au voisinage des parois opposées du canal, et qui présentent des charges de même signe, peuvent se recouvrir, entraînant l'apparition d'une pression de Donnan qui se traduit par des effets de gonflement changeant le comportement hydro-mécanique macroscopique du milieu poreux. On peut par exemple observer

ce type de phénomènes dans les milieux argileux [159, 144].

Remarque : Si ces phénomènes de gonflement sont essentiels dans l'étude du tissu cartilagineux [141, 77, 78], ils demeurent limités dans le cas du tissu osseux [151].

La taille caractéristique de la zone d'influence de ce phénomène étant nanométrique, ses conséquences sur l'écoulement local du fluide s'estompent rapidement lorsqu'on s'éloigne de la paroi. Ainsi, pour des canalicules vides de matrice péricellulaire, dont la taille caractéristique est de l'ordre de $10^{-7}$ m, l'impact des effets électro-osmotiques sur l'écoulement global du fluide au sein des pores peut être négligé, et la poroélasticité classique couplée à la loi de Darcy standard décrit de façon adéquate le flux fluide macroscopique [151].

En revanche, la présence de fibres péricellulaires pourrait modifier grandement l'influence relative des phénomènes hydrauliques et électro-osmotiques sur l'écoulement global au sein du réseau lacuno-canaliculaire. En effet, la distance moyenne entre deux interfaces fluide-solide est alors de l'ordre de la distance fibre à fibre, qui peut, elle, être nanométrique. En nous appuyant sur une étude antérieure réalisée au laboratoire, dont le but était de modéliser le comportement poroélastique du tissu osseux [145], nous avons ainsi cherché à évaluer l'influence relative de ces deux phénomènes sur l'écoulement global du fluide au sein d'un canalicule, en fonction de la distance moyenne fibre à fibre. Les résultats de ce travail sont présentés figure 2.5.

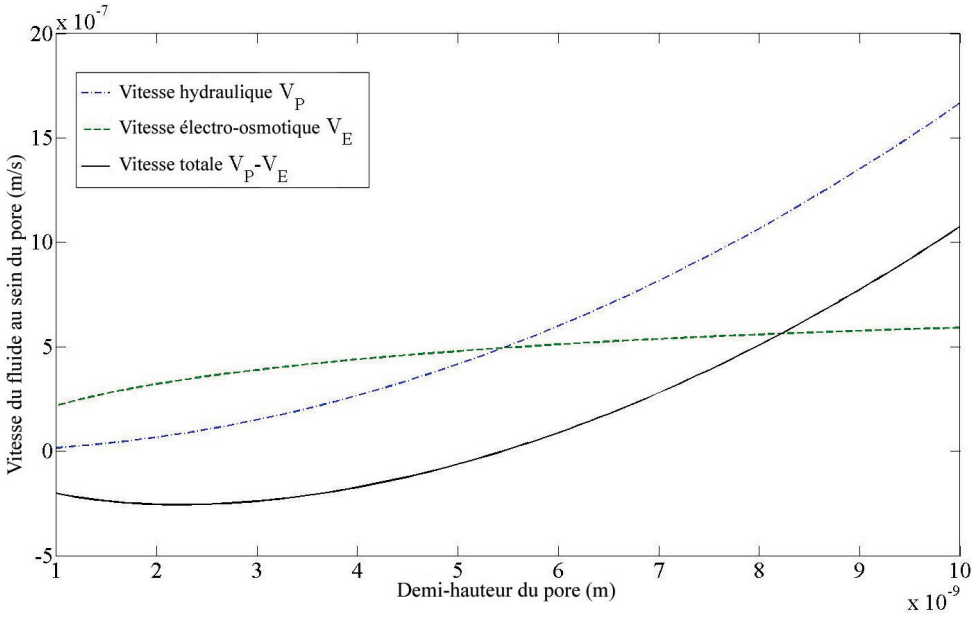



FIGURE 2.5 – Comparaison des vitesses du fluide induites par le gradient hydraulique ($V_P$) et par les phénomènes d'électro-osmose ($V_E$). La vitesse résultante du fluide, somme des deux vitesses précédentes, est également représentée ($V_P - V_E$).

Dans cette étude, menée en 2006 par Lemaire et al. [145], une loi de Darcy modifiée est proposée pour décrire le flux de fluide issu du couplage du gradient de pression et des effets électrochimiques ayant lieu aux parois des pores canaliculaires. Deux paramètres complémentaires de perméabilité $\kappa_E$ et $\kappa_C$ viennent ainsi s'ajouter à la perméabilité hydraulique classique $\kappa_H$, pour rendre compte respectivement des effets électro-osmotiques et chimio-osmotiques dus aux gradients de potentiel électrique $\nabla\psi$ et de concentration $\nabla C$ selon :

$$\overrightarrow{V_{pore}} = \overrightarrow{V_P} + \overrightarrow{V_E} + \overrightarrow{V_C} = -\kappa_H \nabla P - \kappa_E \nabla\psi - \kappa_C \nabla C \tag{2.14}$$

où $\overrightarrow{V_{pore}}$ correspond à la vitesse de Darcy, et $\overrightarrow{V_P}$, $\overrightarrow{V_E}$ et $\overrightarrow{V_C}$ correspondent aux vitesses moyennes des écoulements générés respectivement par les gradients [1] de pression $\nabla P$, de potentiel électrique $\nabla\psi$ et de concentration chimique $\nabla C$. Il est alors possible de montrer que, dans la plage physiologique de gradients physico-chimiques, le terme $-\kappa_C \nabla C$ peut être négligé devant les effets hydrauliques et électro-osmotiques [145]. C'est pourquoi, dans les résultats présentés figure 2.5, seules les vitesses $\overrightarrow{V_P}$ et $\overrightarrow{V_E}$ sont considérées. En s'appuyant sur un code de différences finies développé initialement pour l'étude de ce type de phénomènes dans les milieux argileux [146], un modèle de conduit plan cartésien (de demi-hauteur $h$) a donc été construit pour représenter un pore de densité de charge surfacique négative $\sigma_{elec}$, saturé avec une solution électrolytique aqueuse (de salinité $C$), et estimer les normes de ces deux vitesses pour des valeurs physiologiques des gradients moteurs $\nabla P$ et $\nabla\psi$. Des détails sur la résolution du problème électrique dans des nanopores peuvent être trouvés dans Lemaire et al. [153].

En faisant varier la taille du conduit $h$, il est alors possible de déterminer une taille de pore critique pour laquelle les deux flux (hydraulique et électro-osmotique) se compensent pour des valeurs de gradients physiologiques.Tous les paramètres utilisés pour cette simulation sont regroupés dans le tableau 2.3.

1. Dans la suite de ce document, $\nabla$ représente l'opérateur de différentiation spatiale. Ainsi, pour une quantité $f$ d'un ordre tensoriel donné, on a $\nabla f = grad(f)$ et $\nabla . f = div(f)$.

| Constantes | Symboles | Valeurs | Unités | |
|---|---|---|---|---|
| Constante de Faraday | $F$ | 96490 | C.mol$^{-1}$ | |
| Constante des gaz parfaits | $R$ | 8.3 | J.mol$^{-1}$.K$^{-1}$ | |
| Permittivité électrique du vide | $\varepsilon_0$ | $8.85 \times 10^{-12}$ | A.s.V$^{-1}$.m$^{-1}$ | |
| Paramètres | Symboles | Valeurs | Unités | Références |
| Longueur du canalicule | $l$ | $30 \times 10^{-6}$ | m | [279] |
| Température | $T$ | 310 | K | Corps humain |
| Permittivité relative du fluide | $\varepsilon_r$ | 80 | - | Eau salée |
| Viscosité du fluide | $\mu_f$ | $0.6 \times 10^{-3}$ | Pa.s | Eau salée |
| Densité de charges surfacique | $\sigma_{elec}$ | $-0.20$ | C.m$^{-2}$ | [151] |
| Salinité | $C$ | $10^{-5}$ | mol.m$^{-3}$ | [147] |
| Demi-hauteur du conduit | $h$ | $\{1 - 10\} \times 10^{-9}$ | m | |
| Gradient de pression absolu | $\nabla P$ | $900/L_C$ | Pa.m$^{-1}$ | [8] |
| Gradient électrique absolu | $\nabla \psi$ | $10^{-4}$ /$L_C$ | V.m$^{-1}$ | [101] |

TABLE 2.3 – Valeurs des différents paramètres utilisés pour modéliser les écoulements couplés au sein d'un pore

On peut ainsi remarquer sur la figure 2.5 que, pour des tailles de pores très faibles ($2h < 8$ nm), l'écoulement dominant est celui engendré par les interactions électro-osmotiques, alors que pour des pores plus larges ($2h > 12$ nm), c'est l'écoulement de Poiseuille qui domine. En revanche, pour des pores dont la taille caractéristique avoisine $10$ nm, les deux vitesses $\vec{V_P}$ et $\vec{V_E}$ se compensent, et l'écoulement global du fluide sera donc très faible.

Or, cette taille de pore critique est comparable à la distance fibre à fibre décrite par Weinbaum et al. [265] et You et al. [280]. L'existence de ces phénomènes électrochimiques, concurrents au gradient de pression macroscopique, pourrait donc constituer une explication possible des mesures expérimentales étonnamment basses de la perméabilité $\kappa$ récemment effectuées.

## 2.4 Application à l'ingénierie tissulaire : le problème de la fin de culture

La culture *in vitro* de cartilage et d'os humains représente un enjeu important dans le domaine de la réparation osseuse. En effet, en raison des capacités de régénération limitées de ces deux tis-

sus, il n'existe toujours pas à ce jour de protocole thérapeutique satisfaisant pour prendre en charge les lésions ostéo-articulaires de grande taille. De plus, la plupart des traitements actuels (hormis la pose de prothèses) nécessite un temps de convalescence important et la création d'un site secondaire de lésion (voir chapitre 1), ce qui augmente les risques de complications post-opératoires et limite la taille des lésions pouvant en bénéficier. L'ingénierie tissulaire pourrait donc constituer une alternative thérapeutique très intéressante en réduisant d'une part le temps d'immobilisation nécessaire à la cicatrisation du membre concerné, et en permettant d'autre part de prendre en charge des lésions de taille plus importante.

Comme détaillé dans le chapitre 1, le développement *in vitro* de tissus fonctionnels comprend notamment une phase de culture de l'organoïde obtenu après ensemencement cellulaire, au sein d'un bioréacteur adapté. Ce dernier a pour rôle d'assurer un apport suffisant en oxygène et en nutriments ainsi qu'une sollicitation mécanique adéquate au futur implant, tout au long de sa croissance. La qualité du produit final dépend largement de cette phase [204]. Néanmoins, en raison de la nature vivante des matériaux étudiés, les conditions de culture évoluent au cours du temps, et les apports physico-chimiques extérieurs doivent donc être ajustés en conséquence. En particulier, lors de l'utilisation de bioréacteurs à perfusion pour la culture tridimensionnelle de cartilage, la production de matrice extracellulaire (MEC) réduit progressivement l'espace disponible pour le transport du fluide, rendant toute perfusion efficace de l'ensemble de l'implant de plus en plus difficile. Ainsi, lors des dernières étapes de culture, les pores initiaux du support sont remplis de MEC, rendant la traversée de l'organoïde impossible à l'aide des seuls gradients hydrauliques. L'activité des cellules se trouvant au cœur de l'implant est alors grandement affectée par le renouvellement insuffisant du fluide qui les entoure. Ce problème constitue actuellement le principal frein à la réalisation d'implants de taille conséquente, qui présenteraient pourtant un intérêt clinique indéniable.

C'est pourquoi, dans cette étude, nous nous proposons d'utiliser les propriétés électrochimiques de la MEC et des substrats poreux utilisés lors de l'ensemencement pour vérifier la possibilité d'assurer une perfusion suffisante en oxygène et en nutriments lors des dernières étapes de culture, lorsque les pores sont en grande partie remplis par la MEC et ont tendance à se boucher. Pour cela, nous suggérons d'utiliser une force motrice alternative aux forces de pression : l'électro-osmose. En effet, grâce à ce phénomène, la perfusion de l'implant au travers de la MEC pourrait être réalisée en appliquant un champ électrique à l'organoïde en développement. Dans ce travail, nous

nous intéressons à la faisabilité d'un tel procédé, à l'aide d'une première estimation des champs électriques requis pour assurer une perfusion adéquate des implants. Nous avons pour cela utilisé un code initialement développé au laboratoire pour étudier le comportement des milieux argileux puis étendu aux biomatériaux [153], et qui nous a ici permis d'estimer le flux électro-osmotique généré au sein de la MEC en réponse à différents champs électriques imposés. L'impact de tels champs sur l'activité et la viabilité cellulaire est ensuite discuté.

### 2.4.1 Méthode

#### Détermination du flux de perfusion à assurer au cœur de l'implant

Dans cette étude, on considérera deux tailles caractéristiques de pores : la première correspond aux tailles classiques des pores présents dans les biomatériaux poreux utilisés dans le cadre de l'ingénierie tissulaire ostéo-articulaire, et a pour ordre de grandeur $10 - 1000$ $\mu$m [204]. Ces pores, relativement larges, permettent aux cellules de pénétrer dans le biomatériau lors de l'ensemencement, puis la perfusion fluide du biomatériau durant les premières étapes de la culture. Ils sont facilement colonisables par les cellules (dont la taille moyenne varie entre 5 et 50 micromètres selon le type de cellules employé), puis sont progressivement envahis par la MEC lors du développement du tissu souhaité. La seconde s'étend de $2$ à $40$ nm, et correspond typiquement à l'ordre de grandeur de la taille des pores canaliculaires partiellement remplis de matrice péricellulaire. Ces pores représentent, en fin de culture, le seul réseau possible de perfusion de l'échantillon. Trois types de cellules nous intéressent dans ce travail : les ostéoblastes, les cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM) et les chondrocytes. De plus, bien que plusieurs nutriments soient nécessaires à la réussite de la culture de tels implants, nous nous focaliserons ici sur l'évolution de la concentration en oxygène $C_{ox}$ du fluide interstitiel. A ce propos, le maintien de conditions hyperoxiques ($C_{ox} > 0.2$ mol.m$^{-3}$) semble promouvoir la formation de matrice extracellulaire pour les cultures osseuses [254] et cartilagineuses [97]. Pour assurer des conditions de culture satisfaisantes, la perfusion de l'implant par le fluide doit donc permettre de stabiliser la concentration $C_{ox}$ au-dessus de cette valeur seuil. La vitesse seuil de perfusion $\overrightarrow{V_D}$ à atteindre s'obtient alors directement selon :

$$\left\|\overrightarrow{V_D}\right\| = \frac{\rho_{cell}\, R_{ox}\, L}{C_{ox}}, \tag{2.15}$$

où $\rho_{cell}$ représente la densité cellulaire, $R_{ox}$ est le taux de consommation cellulaire d'oxygène, et $L$ est la longueur d'échantillon à traverser. Comme indiqué dans le tableau 2.4, $R_{ox}$ dépend du type de cellules utilisé, ce qui amène dans notre cas à considérer deux seuils de vitesse de perfusion. En effet, si les taux de consommation d'oxygène sont comparables pour les ostéoblastes [137] et les cellules souches mésenchymateuses [287] et seront notés $R_{ox,H}$ dans la suite de cette étude, celui des chondrocytes, noté $R_{ox,L}$, est lui inférieur d'un ordre de grandeur [164]. L'équation (2.15) nous permet ainsi d'estimer deux vitesses seuil $V_H$ et $V_L$, correspondant respectivement à $R_{ox,H}$ et $R_{ox,L}$.

| Paramètres | Valeurs | Références |
|---|---|---|
| $\rho_{cell}$ | $6.2 \times 10^{12}$ cell.m$^{-3}$ | [217] |
| $L$ | $10^{-2}$ m | [204] |
| $R_{ox,H}$ | $4 \times 10^{-17}$ mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$ | [287] |
| $R_{ox,L}$ | $4 \times 10^{-18}$ mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$ | [164] |
| $V_H$ | $1.24 \times 10^{-5}$ m.s$^{-1}$ | Eq. (2.15) |
| $V_L$ | $1.24 \times 10^{-6}$ m.s$^{-1}$ | Eq. (2.15) |

TABLE 2.4 – Paramètres physiologiques utilisés pour estimer les vitesses de perfusion à atteindre pour assurer une oxygénation suffisante de l'implant.

Remarque : Conformément à l'équation (2.13), cette vitesse macroscopique peut être reliée à la vitesse moyenne du fluide au sein des pores *via* $\eta_f$ et $\theta$. Par soucis de simplification, les biomatériaux considérés étant à forte porosité ($\eta_f \sim 75\%$) et à faible tortuosité ($\theta \sim 1$, cf. paragraphe 3.1.1), on pourra donc parler de ces deux vitesses de manière indifférente en introduisant la vitesse de perfusion $\overrightarrow{V_{in}}$.

**Gradients de pression correspondants**

En se référant à la loi de Darcy dans le cas d'un système unidimensionnel, le gradient de pression $\nabla P$ appliqué au système étudié se déduit de la vitesse de perfusion $\overrightarrow{V_{in}}$ observée selon :

$$\nabla P = -\frac{\mu_f \overrightarrow{V_{in}}}{\kappa}, \tag{2.16}$$

avec $\mu_f = 0.6 \times 10^{-3}$ Pa.s la viscosité dynamique du fluide et $\kappa$ la perméabilité intrinsèque de la matrice solide de l'échantillon à l'instant considéré. Il est raisonnable de penser qu'en fin de culture, la perméabilité de l'échantillon est similaire à celle du tissu osseux ou cartilagineux (selon l'implant développé), soit dans les deux cas de l'ordre de $10^{-18}$ m$^2$ [225, 152]. Pour maintenir un taux d'oxygène satisfaisant, il faudrait alors appliquer un gradient de pression de l'ordre de $1 - 10$ GPa.m$^{-1}$, ce qui, en plus d'être difficilement réalisable, est bien au-dessus du domaine de sollicitations acceptable pour les cellules, et causerait des dommages irréversibles au tissu en développement [29].

Les dispositifs classiques de perfusion fluide sont donc insuffisants pour assurer un renouvellement adéquat du fluide interstitiel au sein de l'implant, la partie aval de ce dernier restant hors d'atteinte. Il est alors nécessaire de proposer une solution alternative à la seule différence de pression comme force motrice du fluide. De plus, les propriétés électrochimiques du fluide et de la MEC, composée de chaînes protéiques chargées négativement en surface, font de ce système un bon candidat pour l'utilisation d'une pompe électro-osmotique pour prendre le relais des pompes hydrauliques et assurer la circulation du fluide en fin de culture.

**Détermination du champ électrique à appliquer**

Comme indiqué au paragraphe 2.3.4, la mise en mouvement des cations présents au voisinage des interfaces fluide-solide permet, *via* les interactions visqueuses existant au sein du fluide, de générer un écoulement secondaire au voisinage des parois, dont l'influence sur l'écoulement global au sein du réseau poreux ne peut être négligée pour des tailles de pore nanométriques, les doubles couches électriques proches des parois occupant dans ce cas une large partie du volume de fluide [152, 145]. Lors de l'utilisation d'un système de perfusion classique, ce phénomène d'électro-osmose est une conséquence non souhaitée de l'écoulement principal obtenu par l'ap-

plication d'une différence de pression aux bornes de l'échantillon, puisqu'il ralentit localement la progression du fluide. Mais, dans le cas de la fin de culture, ces propriétés électrochimiques pourraient être mises à profit en appliquant un champ électrique à l'implant en développement, ce qui permettrait d'imposer un déplacement contrôlé aux charges mobiles de la double couche électrique, et donc de générer un écoulement sans appliquer de gradient de pression, en particulier lorsque celui-ci devient délétère à la survie du tissu étudié.

En nous appuyant sur le code développé au laboratoire, nous nous proposons donc de déterminer l'intensité du champ électrique à appliquer pour atteindre les vitesses seuil de perfusion $V_H$ et $V_L$ définies au paragraphe 2.4.1, en faisant varier la taille des pores nanométriques $h$ et la densité surfacique de charge $\sigma_{elec}$ [231].

Comme précisé au paragraphe 2.3.4, il est possible de montrer que, si l'électro-osmose a une influence importante sur l'écoulement de fluides chargés au sein de pores nanométriques, les effets d'osmose chimique peuvent eux être négligés lors de l'estimation de la vitesse du fluide $\overrightarrow{V_{in}}$ [152], d'où

$$\overrightarrow{V_{in}} = \overrightarrow{V_P} + \overrightarrow{V_E} = -\kappa_H \nabla P - \kappa_E \nabla \psi \tag{2.17}$$

Si la perméabilité hydraulique $\kappa_H$ ne dépend que de la géométrie du réseau poreux et de la viscosité du fluide, la perméabilité électrique $\kappa_E$ ainsi définie varie elle avec le champ électrique appliqué, *via* l'impact de celui-ci sur le potentiel électrique de double couche réduit $\bar{\varphi}$ [145, 148]. Ce dernier dépend de la permittivité du fluide $\varepsilon$, de la température $T$ et de la salinité $C$ du fluide. Il doit de plus vérifier l'équation de Poisson-Boltzmann

$$\nabla . \nabla \bar{\varphi} = \frac{1}{L_D^2} \sinh \bar{\varphi}, \tag{2.18}$$

où la longueur de Debye $L_D$ correspond approximativement à l'épaisseur de la double couche électrique. En notant $\overrightarrow{n_S}$ le vecteur normal à la paroi du pore orienté vers l'extérieur du volume fluide, $\sigma_{elec}$ la charge surfacique de la paroi, $F$ la constante de Faraday et $R$ celle des gaz parfaits, la condition aux limites associée à l'équation (2.18) s'écrit alors

$$\nabla \bar{\varphi} \cdot \overrightarrow{n_S} = \frac{F \sigma_{elec}}{RT\varepsilon}. \tag{2.19}$$

Remarquons que cette équation est fortement non linéaire. Nous avons donc utilisé un code développé au laboratoire [146, 153] pour résoudre cette dernière de manière récursive dans le cas d'un canal droit de demi-hauteur $h$, présentant une charge surfacique $\sigma_{elec}$ et saturé par un fluide électrolytique de salinité $C$.

Le champ électrique à appliquer a donc ainsi été évalué pour une demi-hauteur du pore comprise entre $2$ et $40$ nm, afin de balayer la plage des diamètres susceptibles de constituer le réseau poreux de fin de culture. La densité de charge surfacique $\sigma_{elec}$ des parois étant inconnue, nous avons étendu notre étude à une plage de valeurs plausible pour ce paramètre, définie à partir de la capacité d'adsorption cationique de l'hydroxyapatite [106] et de la charge surfacique des glyco-amino-glycanes [175]. $\sigma_{elec}$ varie donc entre $-0.4$ et $-0.1$ C.m$^{-2}$. Enfin, en raison de la petitesse des pores, l'application d'un gradient de pression est inutile pour assurer la perfusion des implants en fin de culture sans endommager le tissu en développement. Nous considérerons donc pour la suite de cette étude que $\nabla P = \overrightarrow{0}$. Les différents paramètres utilisés pour déterminer la valeur du champ électrique à appliquer sont regroupés dans le tableau 2.5.

| Paramètres | Valeurs | Sources |
|---|---|---|
| Longueur de l'échantillon $L$ | $10^{-2}$ m | Taille classique des biomatériaux |
| Température $T$ | 310 K | Température du corps humain |
| Permittivité électrique relative du fluide $\varepsilon_r$ | 80 | Permittivité relative de l'eau salée |
| Viscosité du fluide $\mu_f$ | $0.6 \times 10^{-3}$ Pa.s | Viscosité de l'eau salée |
| Densité de charges surfacique $\sigma_{elec}$ | $[-0.1, -0.4]$ C.m$^{-2}$ | [175, 106] |
| Salinité $C$ | $10^{-5}$ mol.m$^{-3}$ | [147] |
| Demi-hauteur du pore $h$ | $[1 - 20] \times 10^{-9}$ m | |

TABLE 2.5 – Valeurs des différents paramètres utilisés dans ce modèle

### 2.4.2 Résultats et discussion

Notons $E$ la norme du champ électrique $\overrightarrow{E}$ à appliquer dans la direction de l'écoulement souhaité pour atteindre la vitesse seuil de perfusion. L'évolution de $E$ en fonction de la taille des pores $h$ est présentée figure 2.6 pour plusieurs valeurs de la densité surfacique de charge $\sigma_{elec}$, en différenciant la culture de chondrocytes ($V_L = 1.24 \times 10^{-6}$ m.s$^{-1}$) de celles d'ostéoblastes ou de hCSM ($V_H = 1.24 \times 10^{-5}$ m.s$^{-1}$).

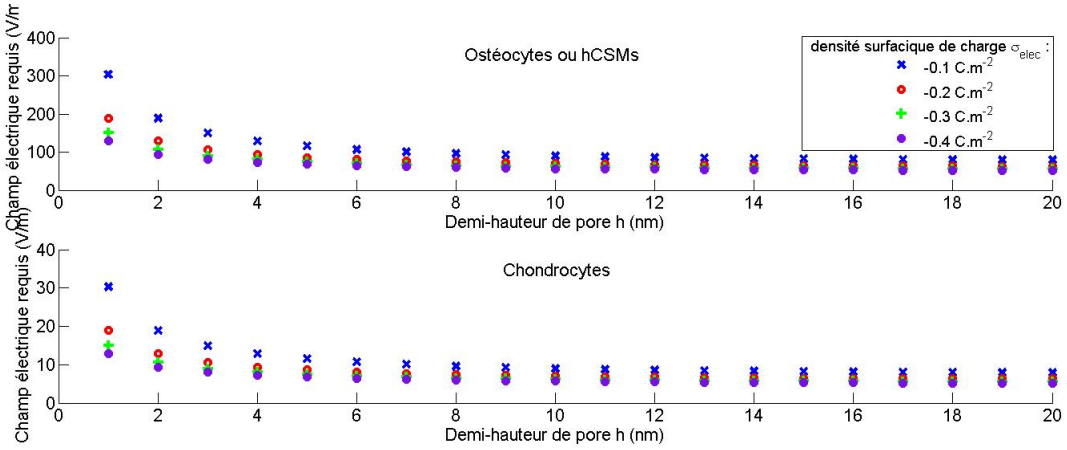



FIGURE 2.6 – Champ électrique nécessaire pour atteindre le seuil de vitesse de perfusion dans le cas de la culture d'ostéocytes ou de hCSM (haut) et de chondrocytes (bas)

Remarquons tout d'abord que, dans les deux cas, la valeur du champ électrique $E$ requis se stabilise pour des valeurs de $h$ supérieures à $10$ nm. Cette valeur correspond donc à l'épaisseur de la zone d'influence des interactions électro-osmotiques. Ainsi, au-delà de cette taille de pore, le volume de fluide occupé par les cations mobiles reste constant, d'où la stabilisation de la valeur de $E$. En revanche, lorsque la taille des pores diminue, cette dernière augmente rapidement.

Nous pouvons ensuite observer que la densité de charge a une influence marquée sur l'intensité du champ électrique à appliquer : à tailles de pore égales, plus $\sigma_{elec}$ est importante, plus $E$ est faible. Cet effet tend cependant à s'estomper pour les densités de charge élevées.

Pour déterminer la faisabilité d'une telle pompe électro-osmotique, il nous reste à vérifier la présence d'éventuels effets secondaires indésirables suite à l'application d'un tel champ sur les cellules présentes au sein de l'échantillon. En effet, le champ $\overrightarrow{E}$ est susceptible, selon son intensité, de modifier la prolifération, la viabilité, la migration ou la production de MEC des cellules.

**Ostéoblastes et cellules souches (hCSM)** En comparant les valeurs de $E$ obtenues sur la figure 2.6 avec celles présentes dans la littérature, on peut remarquer pour commencer que le champ nécessaire au maintien de la vitesse de perfusion – environ $100$ V.m$^{-1}$ – reste inférieur aux stimulations électriques utilisées pour promouvoir la prolifération ou la fabrication de MEC lors des cultures de ce type de cellules [107, 188], de l'ordre de $200$ V.m$^{-1}$. De plus, d'après l'étude de Curtze et al. [53], de telles intensités ne présentent aucun risque pour la viabilité des cellules,

quelle que soit la durée de stimulation. De même, ce niveau de stimulation ne devrait pas engendrer de réorientation ni de migration cellulaire [249, 104]. En revanche, un impact sur la différenciation des cellules souches reste possible [277].

**Chondrocytes** Les chondrocytes sont eux plus sensibles à ce type de stimulation. En effet, si l'intensité du champ électrique à appliquer – environ $10$ V.m$^{-1}$ – reste en-dessous de la valeur létale pour ces cellules [220], il se situe dans la zone d'inhibition de la prolifération cellulaire [11], ce qui constitue un obstacle majeur à son utilisation dans la mise au point de ce type d'implants. Afin de limiter l'impact négatif du champ électrique sur la prolifération, il conviendrait alors de pouvoir maintenir le niveau d'oxygène souhaité au voisinage des cellules tout en diminuant la vitesse de perfusion requise, en augmentant par exemple la concentration en oxygène du fluide perfusant. Il serait également intéressant d'étudier l'évolution d'autres paramètres physico-chimiques, tels que le pH, dans de telles conditions [56].

### 2.4.3 Conclusion

L'utilisation d'une pompe électro-osmotique pourrait donc représenter une alternative intéressante à l'utilisation de pompes hydrauliques lors des derniers stades de culture d'ostéoblastes et de cellules souches mésenchymateuses. Elle présente en effet peu d'effets secondaires, et permettrait d'assurer une oxygénation satisfaisante au cœur des échantillons, zone inatteignable à l'aide des pompes classiques. L'utilisation de ce procédé pour la culture de chondrocytes nécessiterait en revanche un adaptation du protocole (par exemple en modifiant la composition chimique du fluide) car ces cellules, plus sensibles aux stimulations électriques, ne pourraient pas se développer en présence des champs requis.

Les propriétés électrochimiques des biomatériaux et de la matrice extracellulaire, encore peu prises en compte dans la modélisation et la réalisation de protocoles d'ingénierie tissulaire osseuse, pourraient donc ouvrir la voie au développement de techniques de cultures d'implants de grande taille, en adressant le problème de l'oxygénation du cœur des échantillons au cours de leur développement.

## 2.5 Conclusion

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à la détermination de la perméabilité intrinsèque lacuno-canaliculaire de l'os cortical $\kappa$, paramètre clé dans l'étude des phénomènes de transport qui régissent l'activité de ce milieu poreux complexe. Nous avons en particulier pu définir une relation semi-analytique entre les différents paramètres géométriques des pores lacuno-canaliculaires et la perméabilité $\kappa$ *via* la définition d'une taille de pore caractéristique $\delta$ prenant en compte l'existence de la matrice péricellulaire qui remplit partiellement ces pores, et modifie ainsi l'écoulement du fluide en leur sein.

Nous avons de plus montré qu'à cette échelle, d'autres phénomènes physico-chimiques doivent être pris en compte lors de l'étude du transport global du fluide au sein du tissu. Dans le cas des tissus biologiques, en particulier, les fluides et les réseaux poreux étudiés sont électriquement chargés. Les phénomènes d'électro-osmose qui apparaissent alors, bien que localisés au voisinage des parois des pores, ont un effet majeur sur l'écoulement du fluide à l'échelle du tissu. Ces derniers, non pris en compte dans la plupart des modèles associés aux mesures expérimentales récentes de la perméabilité de l'os cortical, pourraient expliquer les résultats étonnants donnés par celles-ci. Ils constituent également une piste d'amélioration pour la perfusion des implants ostéo-articulaires en fin de culture, lorsque la matrice extracellulaire rend la perfusion hydraulique insuffisante pour assurer un environnement physico-chimique adéquat au cœur des échantillons.

Enfin, les outils de modélisation dégagés ici sont adaptables aux différents réseaux poreux intervenant dans le domaine de la réparation ostéo-articulaire (os, cartilage, produits de l'ingénierie tissulaire). Ils constituent donc en particulier des outils intéressants pour guider la mise au point de bioréacteurs, et adapter ces derniers à la capacité de transport du fluide des tissus en développement tout au long de la phase de culture des futurs implants.

# Chapitre 3

# Colonisation cellulaire d'un biomatériau céramique de grande taille

Il n'existe à l'heure actuelle aucune thérapie satisfaisante pour traiter les fractures osseuses de grande taille. En effet, les protocoles existants nécessitent de longs mois de convalescence, pour une qualité de cicatrisation variable d'un patient à l'autre. Ils comportent également des risques de complications importants (voir paragraphe 1.3.3). Dans le cas de l'utilisation de biomatériaux pour combler la lésion, solution qui présente des risques de complications moins élevés qu'une greffe, l'un des freins majeurs à la cicatrisation réside dans la difficulté des cellules à coloniser le cœur du matériau en l'absence de vaisseaux sanguins et de signaux chimiques habituellement produits par d'autres cellules déjà en place [237]. L'existence d'une telle "zone morte" conduit à une cicatrisation partielle de la lésion, limitée à ses extrémités distale et proximale, augmentant les risques de fracture du biomatériau qui, non remodelé, se fragilise au cours du temps. On constate ainsi $60\%$ de fractures de ces implants au bout de 10 ans [271].

La capacité d'un biomatériau à être colonisé par des cellules apparaît donc comme un paramètre clé dans le développement de deux approches thérapeutiques de ce type de fractures : i/ le comblement par un biomatériau seul mais qui permettrait aux cellules présentes à la périphérie de la lésion de migrer en son sein pour permettre une reconstruction en volume de l'os manquant, et ii/ le développement *in vitro* d'organoïdes associant biomatériaux, cellules (ostéocytes, cellules souches mésenchymateuses, etc) et éventuellement facteurs biochimiques, à l'ensemencement et au développement contrôlés, avant implantation de l'ensemble sur le site de fracture. Cette dernière

solution, bien qu'elle représente aujourd'hui un défi technique, aurait l'avantage de combler la lésion avec un tissu vivant, capable de générer les facteurs biochimiques nécessaires à son intégration sur le site de lésion (facteurs angiogéniques, de croissance, etc).

Dans ce contexte, nous avons cherché à évaluer la capacité des biomatériaux de comblement proposés par l'entreprise CERAVER, un de nos partenaires sur ce projet [39], à être colonisés par les cellules environnantes lors de leur implantation sur le site de la lésion. Nous nous sommes en particulier intéressés à la gamme Calcirésorb Bonelike®, dont la structure semble être la plus adaptée à ce type de protocoles (voir paragraphe 3.1.1).

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires (CRRET) de l'Université Paris-Est Créteil, au sein duquel j'ai pu me former aux techniques de manipulation des cellules souches, et réaliser l'ensemble des tests présentés dans ce chapitre. Les cellules utilisées pour ces derniers ont été fournies par le laboratoire Bioingénierie cellulaire et tissulaire de l'Etablissement Français de Sang, situé à l'hôpital Henri Mondor de Créteil.

## Objectifs de l'étude

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de nous focaliser sur les sollicitations mécaniques ressenties par les cellules au niveau des lésions osseuses, qui sont la conséquence de l'écoulement correspondant à la resaturation en fluide du site de lésion, après la mise en place de l'implant. Pour des raisons évidentes de faisabilité technique, bien que la situation qui nous intéresse prenne place *in vivo*, notre étude sera menée *in vitro*.

L'étude de la colonisation cellulaire de biomatériaux *in vitro* est une thématique importante de l'ingénierie tissulaire ostéo-articulaire. Les protocoles d'ensemencement de matériaux poreux sont donc nombreux, et se divisent globalement en trois catégories : l'ensemencement statique, les "*spinner flasks*" et la perfusion fluide. La première consiste à déposer à la surface de l'échantillon à ensemencer la solution cellulaire souhaitée, ou à le plonger dans cette dernière (selon la concentration utilisée), et à laisser les cellules migrer au sein de l'implant sans avoir recours à des sollicitations mécaniques extérieures. La seconde consiste à fixer les biomatériaux à un mât immergé dans la solution cellulaire, puis à agiter cette dernière (à l'aide d'un agitateur magnétique par exemple),

mettant ainsi le fluide en mouvement à une vitesse contrôlée (réglage du nombre de rotations par minute). Enfin, les protocoles de la troisième catégorie consistent à perfuser l'échantillon avec la solution cellulaire, forçant ainsi l'ensemble de la solution à traverser l'implant. Quelques exemples d'implants et de protocoles disponibles dans la littérature sont regroupés dans le tableau 3.1.

| Ref. | Cellules | Biomatériau | Taille | Protocole |
|---|---|---|---|---|
| Wendt et al. [267] | chondrocytes CSMs humaines | mousses polymères $\beta$TCP alvéolaire | disques ($h = 4$ mm, $D = 8$ mm) | statique spinner flask perfusion allers-retours |
| Vunjak-Novakovic et al. [258] | chondrocytes | maillage de fibres PGA | disques ($h = 5$ mm, $D = 10$ mm) | spinner flask |
| Kitagawa et al. [126] | NIH-3T3* | PLLA poreux (pores $\sim 70$ $\mu$m) | tubes ($h = 20$ mm, $D_i = 1$ mm, $D_e = 3$ mm) | perfusion radiale |
| Bueno et al. [30] | chondrocytes | maillage PGA | disques ($h = 2$ mm, $D = 5$ mm) | spinner flask |
| Toh et al. [251] | CSMs porcines | Cytomatrix® (polymère) | – | spinner flask |
| Zhao and Ma [284] | CSMs humaines | matrices PET | disques ($h = 1.2$ mm, $D = 16$ mm) | statique écoulement laminaire tangent à l'implant |
| Wang et al. [260] | CSMs de rats | $\beta$TCP poreux alvéolaire | cubes ($h = 5$ mm) | aspiration à travers l'implant |

TABLE 3.1 – Différents biomatériaux et protocoles d'ensemencement utilisés dans le développement *in vitro* d'organoïdes destinés à la réparation tissulaire ostéo-articulaire. Des revues plus détaillées sur ce sujet peuvent être trouvées dans Bueno et al. [30] et Wendt et al. [268]. $h$ : hauteur, $D$ : diamètre, $D_i$ : diamètre intérieur, $D_e$ : diamètre extérieur. *NIH-3T3 : lignée de fibroblastes immortels embryonnaires de souris.

Un protocole d'ensemencement, pour être efficace, doit permettre de greffer un grand nombre de cellules au sein de l'implant, tout en assurant une répartition en volume la plus homogène possible [30]. En effet, il a été montré qu'une densité cellulaire élevée (supérieure à $8 \times 10^6$ cellules$/$cm$^3$) favorisait la communication cellulaire au sein de l'implant, donnant ainsi un tissu final mieux structuré et aux propriétés mécaniques renforcées. En revanche, dans le cas d'une faible densité initiale (en-dessous de $4 \times 10^6$ cellules$/$cm$^3$), on observe un ralentissement de la prolifération cellulaire, ce qui peut conduire à une perte d'intégrité du tissu formé [30, 258]. Par ailleurs,

une répartition hétérogène des cellules augmente la probabilité de formation d'agglomérats cellulaires, qui ont un effet inhibiteur sur la prolifération, alors qu'une distribution cellulaire homogène, en facilitant l'accès des cellules aux nutriments, améliore le taux de survie cellulaire. Cette dernière favorise également une production homogène de matrice extracellulaire (MEC) et donc une croissance tissulaire homogène, évitant ainsi la formation de gradients importants de nutriments et de métabolites au sein de l'implant [30, 259].

D'après les données disponibles dans la littérature, il semble que les protocoles statiques conduisent à un dépôt des cellules à la surface des implants, sans réelle pénétration en volume [267, 126]. L'emploi des "*spinner flasks*" permet d'améliorer cet aspect, en créant un écoulement fluide au sein du biomatériau. Malgré tout, les cellules restent en majorité dans une couronne située à la périphérie de l'implant (plus ou moins large selon la structure du matériau), et leur concentration décroît rapidement lorsqu'on s'approche du centre du biomatériau [267, 30]. Cette technique d'ensemencement ne permet donc pas de répartir les cellules de façon homogène au sein d'implants de grande taille. La perfusion de fluide semble être plus adaptée à ces derniers et permettre une colonisation plus homogène des biomatériaux [267, 126]. De plus, un écoulement unidirectionnel semble être la façon la plus adéquate de simuler la resaturation en fluide d'un milieu poreux.

L'objectif de cette étude est donc de mettre au point un dispositif expérimental permettant d'évaluer la capacité des biomatériaux de la gamme Calcirésorb® Bonelike (voir paragraphe 3.1.1) à être colonisés par des cellules mésenchymateuses (hCSM), choisies en raison de leur rôle majeur dans la réparation osseuse (voir chapitre 1), en présence d'un écoulement fluide unidirectionnel. Cette évaluation devra inclure le nombre de cellules greffées sur l'implant, leur taux de viabilité et leur répartition au sein de l'échantillon. Bien que les paramètres environnementaux susceptibles d'influencer les comportements cellulaires soient extrêmement variés, nous avons choisi de nous concentrer ici sur les aspects mécaniques de ce système. C'est pourquoi, nous étudierons l'influence des variables suivantes : la densité cellulaire, le débit et la durée de l'écoulement, la nature du chargement hydraulique (continu ou pulsé) et le délai entre l'injection des cellules et la mise en mouvement du fluide.

Ainsi, la première partie de ce chapitre sera consacrée à la description du protocole d'ensemencement mis en place, ainsi que des méthodes d'évaluation utilisées pour évaluer le comportement cellulaire. Nous exposerons ensuite les résultats obtenus en terme de densité et de viabilité

cellulaires dans la deuxième partie, avant de nous intéresser à la répartition des cellules après ensemencement dans la troisième partie, et de discuter ces résultats à la lumière d'études précédentes disponibles dans la littérature.

## 3.1 Matériel et méthodes

### 3.1.1 Protocole de test

#### Culture cellulaire

Ce protocole d'ensemencement a été réalisé avec des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM) provenant d'un prélèvement de $5$ ml de moelle osseuse effectué après consentement éclairé du patient à l'hôpital Henri Mondor de Créteil. Un seul prélèvement a été utilisé pour l'ensemble de cette étude, afin d'éliminer les variations de comportement cellulaire liées à l'âge, au sexe et aux antécédents médicaux du donneur. Immédiatement après sa réception, l'échantillon de moelle a été mis en flasque à une densité d'environ $2 \times 10^5$ cellules/cm$^2$, et dilué avec $35$ ml de milieu de culture, puis placé en incubateur à $37$°C sous atmosphère contrôlée ($21\%$ $O_2$, $5\%$ $CO_2$) pendant $48$h, afin de permettre aux cellules souches mésenchymateuses d'adhérer au fond de la flasque, les isolant ainsi des autres types de cellules présents dans la moëlle osseuse (cellules hématopoïétiques par exemple).

Le milieu de culture, composé de Minimum Essential Medium $\alpha$ (Gibco®, Life Technologies) supplémenté avec $10\%$ de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco®, Life Technologies) et $1\%$ de Pénicilline/Streptomicine $100$X (Gibco®, Life Technologies), a été changé une première fois au bout de cette période d'adhésion, puis renouvelé tous les $3$ jours jusqu'à ce que les cellules atteignent un taux de confluence d'environ $80\%$ (*i.e.* jusqu'à ce qu'elles occupent $80\%$ de la surface disponible dans la flasque de culture). A ce stade, les cellules ont été décrochées de leur flasque (trypsine $0.05\%$ EDTA, Gibco®, Life Technologies), puis réensemencées à une densité de $1000$ cellules/cm$^2$ et replacées en culture jusqu'à atteindre à nouveau un taux de confluence proche de $80\%$. L'ensemble de la population cellulaire a alors été congelé et conservé à $-180^{\circ}C$ (azote liquide). Les ampoules de cellules ainsi obtenues ont ensuite été progressivement décongelées au fur et à mesure de l'avancée de l'étude et amplifiées à nouveau.

Remarque : La phase de culture cellulaire a pour objectif de permettre la prolifération des cellules par divisions successives. Le "vieillissement" de la population cellulaire étudiée est alors directement relié au nombre de divisions effectuées, qui peut être évalué en comparant la taille des populations finale et initiale. Au cours de cette phase, les cellules doivent être régulièrement repiquées, *i.e.* décollées de leur flasque de culture et réensemencées à densité plus faible, afin de leur garantir un espace de prolifération suffisant. La fréquence de ces repiquages (ou passages) dépend de la taille des cellules, de celle des flasques utilisées et de la densité d'ensemencement. Le nombre de passages effectués n'est donc pas directement relié à la jeunesse des cellules cultivées. Néanmoins, dans cette étude, on s'intéresse à un unique type cellulaire (issu d'un unique prélèvement de moelle osseuse), cultivé dans des flasques identiques et en utilisant une densité de réensemencement constante. On peut donc supposer en première approche que dans notre cas, le taux de vieillissement sera semblable d'un lot de cellules à l'autre à la fin d'un passage donné.

Les expériences ont été ainsi réalisées à la fin du quatrième passage. Remarquons qu'il s'agit là d'un stade relativement tardif pour des tests effectués sur une culture de cellules de patient (culture primaire). Dans le cadre d'une étude sur la prolifération et/ou la différenciation de ces dernières, il serait préférable d'arrêter l'amplification à un stade plus précoce, car les divisions et réensemencements successifs pourraient détériorer le caractère souche des cellules. En revanche, leurs capacités d'adhésion ne sont *a priori* pas affectées, et l'utilisation de ce stade plus tardif nous garantit une réserve suffisante de cellules pour mener à bien l'ensemble de notre travail sans avoir recours à un nouveau prélèvement de moelle osseuse, et donc à un nouveau patient.

**Préparation des biomatériaux**

L'entreprise CERAVER, associée à ce projet, développe et produit plusieurs types de biomatériaux, de prothèses et d'équipements de chirurgie assistée par ordinateur [39]. Parmi eux, les produits de la marque Calcirésorb sont destinés à la reconstruction osseuse. Il s'agit de biomatériaux constitués de phosphate tri-calcique $\beta$ ($\beta$TCP) associé ou non, en fonction des applications souhaitées, à de l'hydroxyapatite ou à des fibres de collagène. Au sein de cette marque, nous nous sommes intéressés aux produits de la gamme Calcirésorb® Bonelike, constitués uniquement de $\beta$TCP, et dont la structure semble la plus adaptée à un ensemencement cellulaire en volume. En effet, ces produits possèdent une structure alvéolaire, pour une porosité totale d'environ $75\%$,

constituée à $90\%$ de pores macroscopiques connexes dont la taille varie entre $100$ et $400$ $\mu$m, ce qui les situe dans la plage de tailles de pores favorable à l'ostéosynthèse [124, 122]. Le reste de la porosité est composé de micropores, de taille inférieure à $10$ $\mu$m et à la connexité inconnue. La structure de ces biomatériaux est visible sur la figure 3.1. Pour comparaison, nous avons juxtaposé une image de la strucure d'un implant de la gamme Calciresorb® Classic. On peut alors observer que ces derniers présentent une macroporosité non connexe, ce qui rend toute colonisation cellulaire volumique impossible.

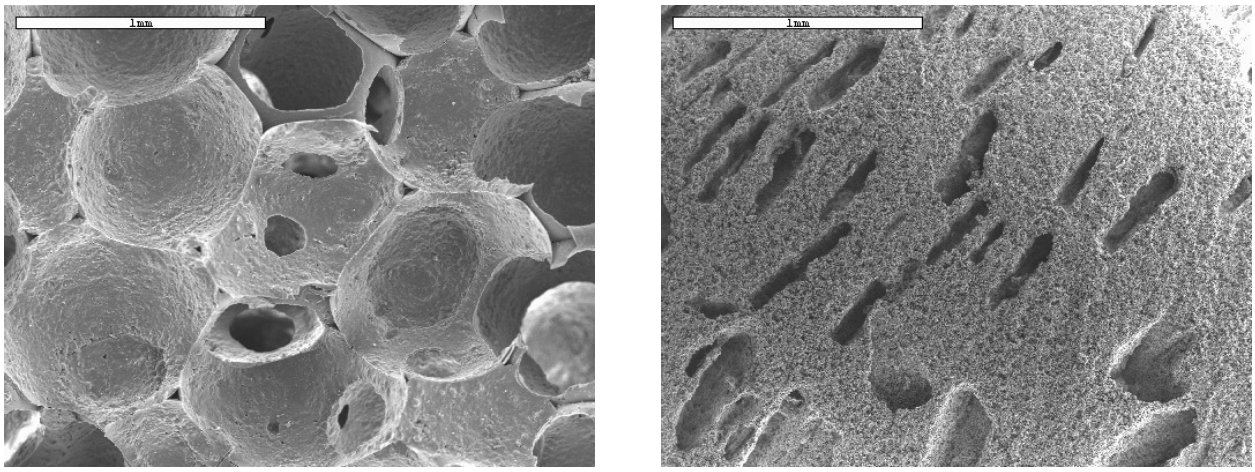



FIGURE 3.1 – Structure des biomatériaux de la marque Calcirésorb® observée par microscopie électronique à balayage (MEB). La barre blanche représente 1 mm. A) Implant Calcirésorb® BoneLike, structure alvéolaire et porosité totale de $75\%$. B) Implant Calcirésorb® Classic, porosité de $45\%$ non connexe. Images réalisées avec l'aide du laboratoire LISA (UMR CNRS 7583, Université Paris-Est Créteil).

Parmi les différentes tailles et formes d'implants disponibles dans cette gamme, nous avons choisi de travailler avec des cylindres de $10$ mm de hauteur de $8$ mm de diamètre (figure 3.2), ce qui situe nos échantillons dans la catégorie des implants de grande taille (voir section 1.3.2).

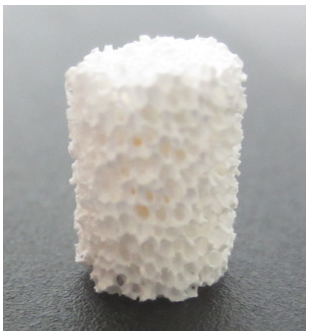


FIGURE 3.2 – Implant Calcirésorb® BoneLike retenu pour la suite de l'étude.

Pour éviter la formation de bulles d'air lors de la saturation en fluide des biomatériaux au sein du dispositif expérimental, ces derniers ont été immergés dans du milieu de culture non supplémenté en sérum de veau fœtal et antibiotiques pendant au moins 24h avant leur utilisation.

**Dispositif expérimental et protocole de test**

Un dispositif expérimental a été conçu puis réalisé spécialement pour cette étude, afin d'assurer une perfusion contrôlée du biomatériau (voir figure 3.3). Ce dernier est entouré d'une gaine protectrice (figure 3.3.C) permettant sa manipulation et assurant l'étanchéité au niveau des parois de la chambre d'écoulement dédiée. Il est ensuite placé dans un logement aux dimensions adaptées, situé au milieu de la chambre d'écoulement (figure 3.3.B). Cette dernière est alors saturée en milieu de culture (voir paragraphe 3.1.1) et raccordée à une pompe péristaltique (FISHERBRAND, Fisher Scientific). L'étanchéité globale du système est assurée par un ensemble de vis et de joints.

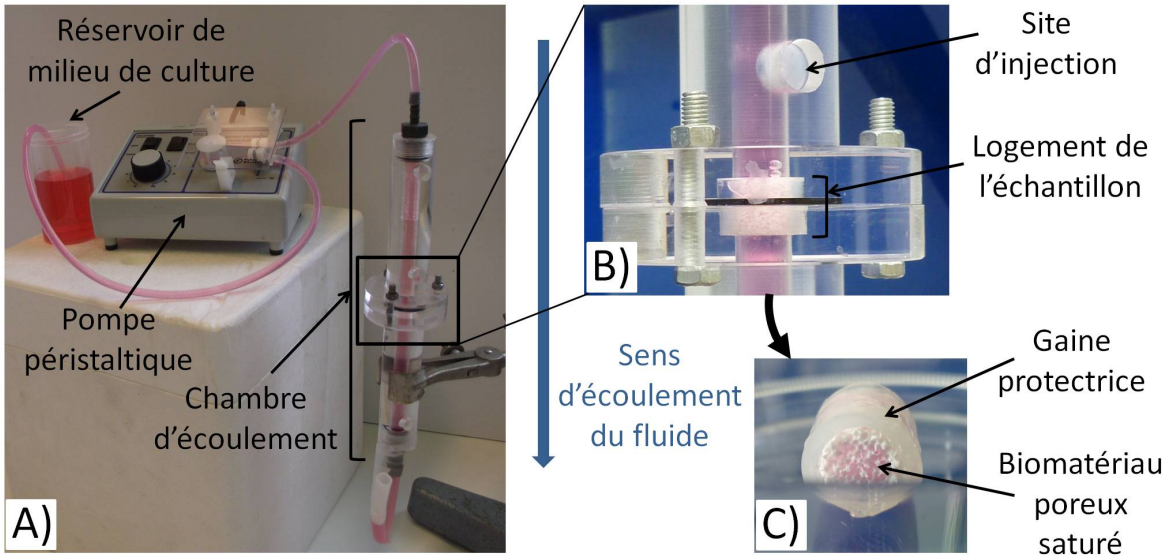



FIGURE 3.3 – Dispositif expérimental mis en place lors de l'ensemencement cellulaire. A) : dispositif global : chambre d'écoulement raccordée à la pompe péristaltique. B) : zone de la chambre d'écoulement comprenant l'échantillon et le site d'injection. C) : échantillon entouré de sa gaine protectrice en silicone après saturation.

Une fois le dispositif mis en place, les cellules à ensemencer sont décollées de leur flasque (trypsine $0.5\%$ EDTA, Gibco®, Life Technologies), remises en suspension à une densité de $10^6$ cellules/$600$ $\mu$L, puis lentement injectées à la seringue ($30$ secondes pour $600$ $\mu$L, aiguille de diamètre extérieur $0.6$ mm, NEOLUS, TERUMO) à travers une membrane d'injection (septum universel pour injecteur GC, diamètre $10$ mm, VWR) en amont de l'implant (figure 3.3.B). La

distance entre le site d'injection et le biomatériau est suffisamment importante pour que les perturbations de l'écoulement liées à l'injection soient limitées lorsque l'échantillon est atteint par le fluide injecté. Après un éventuel temps de pause (voir paragraphe suivant), l'écoulement souhaité est ensuite appliqué au montage, avant de laisser le système reposer pendant une durée de $2$ h $30$ min au minimum, permettant ainsi l'adhésion, même partielle, des cellules au substrat céramique [86]. Enfin, l'échantillon est soit soumis au protocole de comptage des cellules, soit progressivement déshydraté puis inclus dans une résine en poly (méthyl méthacrylate) (PMMA) pour réaliser des coupes histologiques. Dans les deux cas, nous avons récupéré le fluide situé en aval du biomatériau et compté les cellules qui s'y trouvaient. Chaque test a été réalisé au moins trois fois.

**Paramètres étudiés**

Pour déterminer l'impact des sollicitations mécaniques extérieures sur la colonisation cellulaire des implants, nous avons concentré notre étude sur cinq paramètres présentés dans le tableau 3.2. La vitesse moyenne du fluide tout d'abord, contrôlée *via* le débit imposé par la pompe péristaltique en entrée du montage, nous permet de moduler l'intensité de la sollicitation mécanique ressentie par les cellules, et donc l'énergie mécanique reçue par ces dernières à déplacement constant. Compte-tenu des ordres de grandeur des vitesses et des diamètres hydrauliques mis en jeu, l'écoulement reste en régime laminaire, comme illustré au chapitre suivant par l'équation (4.3). La chambre d'écoulement utilisée étant un conduit cylindrique rigide, de section droite constante $S_c$, et le fluide étant incompressible, la vitesse moyenne d'écoulement $\overrightarrow{V_{in}}$ est directement reliée au débit volumique $\overrightarrow{Q}$ du fluide par $\overrightarrow{V_{in}} = \overrightarrow{Q}/S_c$.

De plus, l'injection des cellules se fait en introduisant dans le système un volume $V_1$ de solution cellulaire, inférieur au volume de fluide $V_2$ contenu entre le site d'injection et la face amont du biomatériau (voir figure 3.4). Le temps de pause ensuite observé avant la mise en marche de la pompe permet au cellules de sédimenter au niveau de cette face. Compte-tenu des propriétés de la chambre d'écoulement, la durée de perfusion $t_{fl}$ effectuée à vitesse constante $\overrightarrow{V_{in}}$ peut alors être exprimée en distance *via* $d_{fl} = t_{fl} \times \left\| \overrightarrow{V_{in}} \right\|$. La distance perfusée $d_{fl}$ constitue le deuxième paramètre de cette étude. En la faisant varier à vitesse d'écoulement fixe, nous avons ainsi pu modifier, pour une même intensité de sollicitation, l'énergie transmise aux cellules.

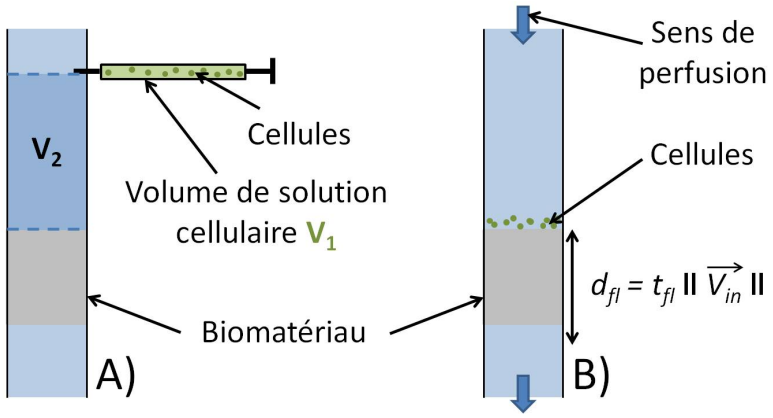



FIGURE 3.4 – Représentation schématique des étapes d'injection et de perfusion. A) : Injection des cellules : un volume $V_1$ de solution cellulaire, inférieur au volume de fluide $V_2$ compris entre le site d'injection et le biomatériau, est introduit dans le système. B) : Perfusion : après un temps de pause qui permet aux cellules de sédimenter à la surface du biomatériau, on actionne la pompe péristaltique à vitesse constante. Le temps de perfusion $t_{fl}$ est alors proportionnel à la distance perfusée $d_{fl}$.

Par ailleurs, la nature du chargement mécanique pourrait également avoir un impact sur la progression des cellules. Nous avons donc appliqué deux types d'écoulement fluide – continu (un seul cycle de chargement) ou pulsé (alternance de périodes de chargement et de périodes de relaxation) – pour déterminer l'importance de cette influence. De plus, au moment où elles entrent dans la chambre de flux, les cellules ont déjà subi plusieurs stimulations mécaniques (centrifugation, injection) et chimiques (trypsine). Bien que chacune de ces dernières, appliquée seule, soit *a priori* non délétère pour les cellules, leurs applications successives pourraient endommager une structure cellulaire déjà éprouvée. L'observation d'un temps de pause entre l'injection et le début de l'écoulement pourrait alors permettre de limiter l'accumulation de sollicitations ressenties par les cellules au moment de la mise en place du flux fluide. Enfin, la quantité de cellules injectées est directement liée à la probabilité de formation d'agrégats ou d'occlusion des pores au niveau des interconnexions [30, 258].

| Paramètres | Valeurs | Remarques |
|---|---|---|
| Vitesse d'écoulement | $\{0 - 3.17 - 9.7\} \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$ | adapté de Wendt et al. [267] |
| Distance perfusée | $\{1 - 1.8 - 3.2\}$ cm | |
| Nature du flux | continu, pulsé | |
| Densité cellulaire | $\{1 - 2 - 2.5\} \times 10^6$ cellules/échantillon | $10^6$ cellules/échantillon correspond à l'étude de Braccini et al. [24] |
| Temps de pause avant flux | $\{0$ (flux pulsé$) - 5 - 30\}$ min | |

TABLE 3.2 – Paramètres physiques étudiés et plages de valeurs correspondantes

### 3.1.2 Méthode de comptage utilisée

L'une des difficultés de cette étude réside dans la capacité à compter de manière précise le nombre de cellules greffées sur l'échantillon au cours du protocole d'ensemencement. Or, réaliser ce type de mesures sur des échantillons tridimensionnels reste une entreprise délicate [213]. Une technique couramment employée pour ce type d'échantillons est la fluorescence ADN, qui consiste à détruire la membrane des cellules greffées à l'aide d'actions enzymatiques puis de cycles de congélation/décongélation, avant de rincer l'implant pour récupérer les débris cellulaires, et de mettre ces derniers en contact avec un agent fluorescent qui se fixe à l'ADN. On peut alors, par lecture optique, déterminer la quantité d'ADN présente dans la solution de rinçage de l'échantillon, et donc le nombre de cellules initialement présentes dans l'implant.

Cette méthode, bien que largement répandue, ne peut en revanche être utilisée ici pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elle ne permet pas d'évaluer le taux de viabilité des cellules, puisqu'il s'agit d'un protocole destructeur. De plus, il a été constaté lors d'études antérieures réalisées au laboratoire CRRET que les comptages obtenus par cette méthode présentaient une grande variabilité pour les échantillons en phosphate tri-calcique (TCP). Pour des dispositifs expérimentaux simples (biomatériau plongé dans une solution cellulaire, le tout placé dans un récipient fermé), une solution alternative peut alors être employée en comptant non pas les cellules greffées sur le biomatériau, mais celles restées dans la solution, qui représentent leur complémentaire. Malheureusement, cette solution ne peut être appliquée dans notre cas, le dispositif utilisé étant trop complexe pour s'assurer que toutes les cellules non greffées sur le matériau soient bien récupérées.

D'après les travaux de Piccinini et al. [213], ce comportement particulier des échantillons en

TCP pourrait être dû à des interactions ADN-TCP, qui empêcheraient la récupération de la totalité de l'ADN présent dans le biomatériau après destruction des membranes cellulaires, et conduiraient donc à sous-évaluer fortement la quantité de cellules greffées. Les auteurs de ces travaux ont donc proposé une méthode de comptage alternative, qui combine l'action de deux enzymes : la collagénase de type I et la trypsine [232, 24]. C'est cette méthode que nous avons adaptée dans ce travail pour obtenir un protocole de comptage cellulaire reproductible (schématisé dans la figure 3.5), non destructif pour le dispositif expérimental et permettant d'évaluer la quantité de cellules greffées et leur taux de viabilité.

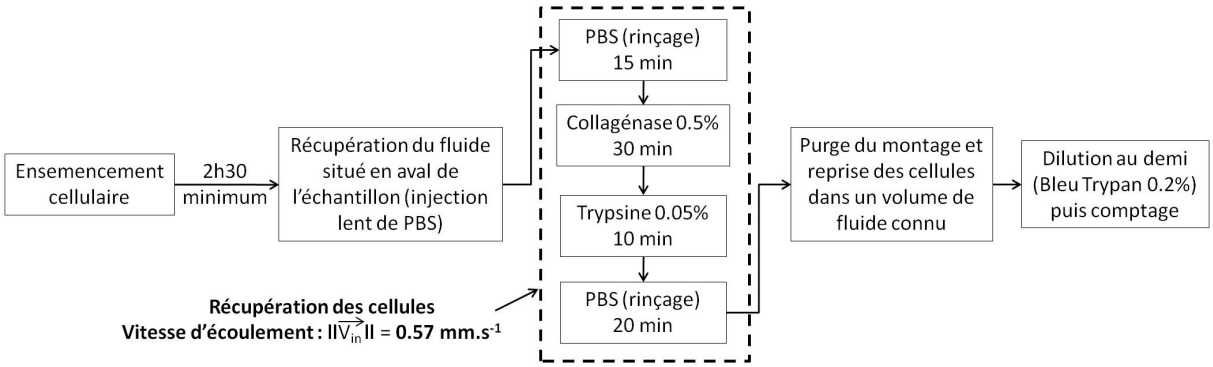



FIGURE 3.5 – Protocole utilisé pour récupérer puis compter les cellules présentes dans le biomatériau après ensemencement.

Ainsi, après avoir observé un temps de repos minimum de $2\text{h}30$ pour permettre aux cellules d'adhérer au support, on injecte lentement une solution de tampon phosphate salin (PBS) en aval de l'échantillon, pour remplacer le milieu de culture aval sans perte de saturation et compter les éventuelles cellules ayant traversé le biomatériau. On impose ensuite un cycle de rinçage à l'échantillon en le perfusant à une vitesse constante de $5.77\times10^{-4}$ m.s$^{-1}$ avec quatre solutions successives. La première étape de ce rinçage est réalisée avec du PBS pendant $15$ minutes, pour éliminer les protéines présentes dans le milieu de culture et susceptibles d'inhiber les futures actions enzymatiques. Puis, de manière semblable au protocole de Scaglione et al. [232] et Braccini et al. [24], une solution de collagénase de type I à $0.5\%$ massique (réalisée à partir de collagénase de type I solide, C-0130, Sigma®) prend le relais pendant $30$ minutes, suivie d'une solution de trypsine à $0.05\%$ (EDTA, Gibco®, Life Technologies) pendant $10$ minutes. Enfin, l'échantillon est une nouvelle fois rincé au PBS pendant $20$ minutes, pour s'assurer de récupérer l'ensemble des solutions

enzymatiques. Remarquons que la collagénase, dont le rôle principal dans ce protocole est de couper les liaisons de collagène cellules/MEC, a certainement peu d'impact ici sur le détachement des cellules, qui n'ont pas le temps de fabriquer de matrice extracellulaire. Néanmoins, il est important de garder cette étape du protocole dans la perspective d'études ultérieures portant sur la mise en culture *in vitro* pendant plusieurs jours des implants ensemencés.

Une fois le rinçage terminé, la solution cellulaire récupérée est remise en suspension dans un volume contrôlé de milieu de culture, puis diluée au demi avec une solution de Bleu Trypan à $0.2\%$ (Milerium, VWR) et comptée sur une grille de Malassez. Ce colorant pénètre dans les cellules mortes, leur donnant une teinte bleue foncée, alors que les cellules vivantes apparaissent blanches et brillantes. Il est donc possible, en comptant les cellules vivantes d'un côté et les mortes de l'autre, de déterminer le nombre total de cellules initialement présentes dans le biomatériau et leur taux de viabilité.

Pour nous assurer de la fiabilité de ce protocole, nous l'avons validé sur des échantillons ensemencés selon un protocole utilisé lors d'études antérieures réalisées au laboratoire CRRET. Nous avons ainsi placé les échantillons à tester (identiques à ceux utilisés pour les tests d'ensemencement), entourés de leur gaine protectrice, au centre d'un puits de culture, et avons déposé sur leur face supérieure $300$ $\mu$L de solution cellulaire contenant le nombre de cellules à ensemencer. Quatre densités cellulaires ont ainsi été testées : $0.5$, $1$, $2.5$ et $3$ millions de cellules. Après avoir ajouté $7$ ml de milieu de culture dans chaque puits, les échantillons ont été placés dans un incubateur pendant une nuit. Le lendemain, nous avons soumis les implants à notre test de comptage, et compté également les cellules restées au fond des puits, en différenciant à chaque fois les cellules mortes et vivantes, pour évaluer le taux de viabilité des cellules récupérées. Les résultats de ces tests sont présentés figure 3.6.

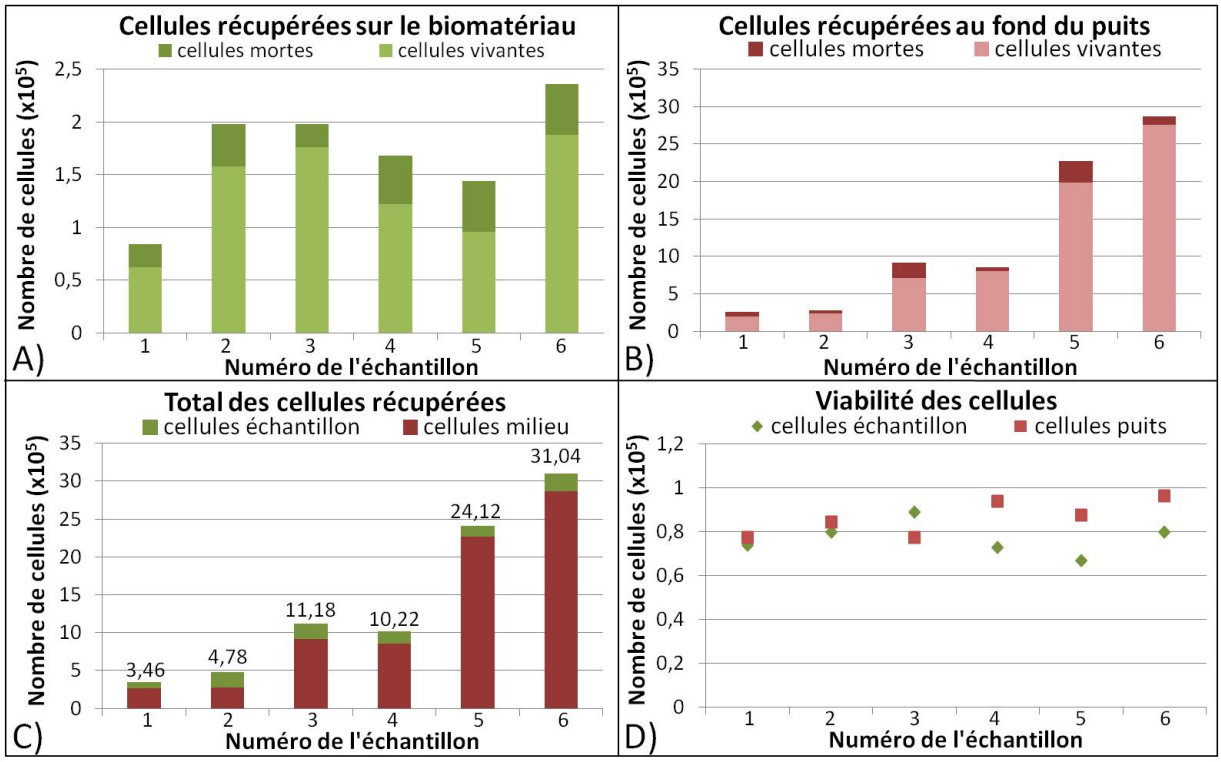



FIGURE 3.6 – Comptage des cellules présentes dans les échantillons et au fond des puits après une nuit. Nombre initial de cellules : 500000 (échantillons 1 et 2), 1 million (échantillons 3 et 4), 2.5 millions (échantillon 5) et 3 millions (échantillon 6). A) : Cellules attachées au biomatériau après l'ensemencement. B) : Cellules récupérées au fond des puits C) : Nombre total de cellules récupéré. D) : Taux de viabilité cellulaire.

On remarque alors que, pour les échantillons 2 à 6, le nombre de cellules total retrouvé correspond au nombre initial de cellules injecté, aux imprécisions expérimentales près (écart inférieur ou égal à $10\%$ pour la plupart des échantillons). On observe en revanche un déficit de $1.5 \times 10^4$ cellules pour l'échantillon 1, qui pourrait être expliqué par un problème survenu lors de la récupération des solutions enzymatiques utilisées pour ce dernier. En effet, en comparant les résultats des implants 1 et 2, ensemencés avec la même quantité cellulaire, on peut remarquer que les cellules "manquantes" dans le cas de l'implant 1 se situaient sur le biomatériau ($8.4 \times 10^4$ cellules récupérées pour l'implant 1 contre $2 \times 10^5$ pour l'implant 2) et non dans le puits de culture.

Par ailleurs, la densité cellulaire initiale ne semble pas influencer le nombre de cellules greffées sur l'échantillon, qui reste compris entre $10^4$ et $2.5 \times 10^4$, ce qui représente un taux de colonisation très faible. Ces résultats, conformes à ceux disponibles dans la littérature [267, 126, 96], confirment une fois de plus la nécessité de mettre au point des protocoles d'ensemencement efficaces (non statiques) pour ce type de biomatériaux.

Enfin, le taux de viabilité des cellules récupérées sur les échantillons est en moyenne de $77\%$, contre $86\%$ pour les cellules restées au fond des puits. Cette différence, qui reste malgré tout limitée, peut être due soit à des conditions physico-chimiques moins favorables au sein des implants (espace restreint, apport de nutriments), soit aux sollicitations supplémentaires subies par ces cellules lors du protocole de comptage (flux, action enzymatique).

Ce protocole de comptage permet donc d'estimer de manière assez fiable et rapide la quantité de cellules greffées sur un échantillon après ensemencement, tout en apportant une information sur leur viabilité. De plus, il est non destructeur pour l'échantillon, ce qui permet le cas échéant de récupérer ce dernier pour observer sa structure, après inclusion dans une résine adaptée (voir protocole d'histologie). C'est donc cette méthode que nous utiliserons dans la suite de cette étude.

## 3.2 Résultats

Nous allons nous intéresser dans cette partie à l'influence des différents paramètres cités ci-dessus sur le nombre de cellules ensemencées et leur taux de viabilité . La répartition de ces dernières au sein des échantillons fera l'objet de la partie suivante. Dans la suite de ce chapitre, nous raisonnerons à partir des valeurs moyennes et des écarts types obtenus pour les différentes combinaisons de paramètres. L'ensemble des données expérimentales est présenté dans l'annexe B, et complété par une analyse de sensibilité des paramètres étudiés dans l'annexe C.

### 3.2.1 Influence de la densité cellulaire et de la nature du chargement

Intéressons-nous dans un premier temps à l'influence de la densité cellulaire sur la qualité de l'ensemencement. Sur la figure 3.7.B, les points bleus correspondent à des tests réalisés avec $1$ million et $2,5$ millions de cellules respectivement, ce qui correspond à des densités de $2 \times 10^6$ et $5 \times 10^6$ cellules/cm$^3$. Dans les deux cas, un écoulement continu de vitesse moyenne $9.7 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$ a été appliqué au système $30$ min après l'injection des cellules, jusqu'à ce que le volume de fluide contenant les cellules ait parcouru $1.8$ cm . Le point jaune correspond quant à lui à un échantillon ensemencé avec $2$ millions de cellules, soit une densité de $4\times10^6$ cellules/cm$^{-3}$, à l'aide d'un flux pulsé. Ce dernier consiste en une série de courtes périodes d'écoulement, réparties tout au long des 30 minutes qui suivent la fin de l'injection cellulaire et détaillées dans le tableau 3.3.

| Temps | Durée de l'écoulement (s) | Distance perfusée (mm) |
|---|---|---|
| $t = 0$ | 0 | 0 (fin de l'injection des cellules) |
| $t = 1$ min | 3 | 2.077 |
| $t = 2$ min | 3 | 2.077 |
| $t = 5$ min | 4 | 2.769 |
| $t = 15$ min | 6 | 4.154 |
| $t = 30$ min | 10 | 6.923 |

TABLE 3.3 – Durée et espacement des cycles de chargement constituant l'écoulement pulsé réalisé.

La vitesse moyenne de l'écoulement est maintenue pour chaque période à la valeur constante de $9.7 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$, et la distance perfusée cumulée vaut $1.8$ cm, comme pour les deux cas précédents. Enfin, les résultats d'un protocole d'ensemencement statique ont également été rajoutés sur la figure 3.7 pour comparaison (point vert, 1 million de cellules).

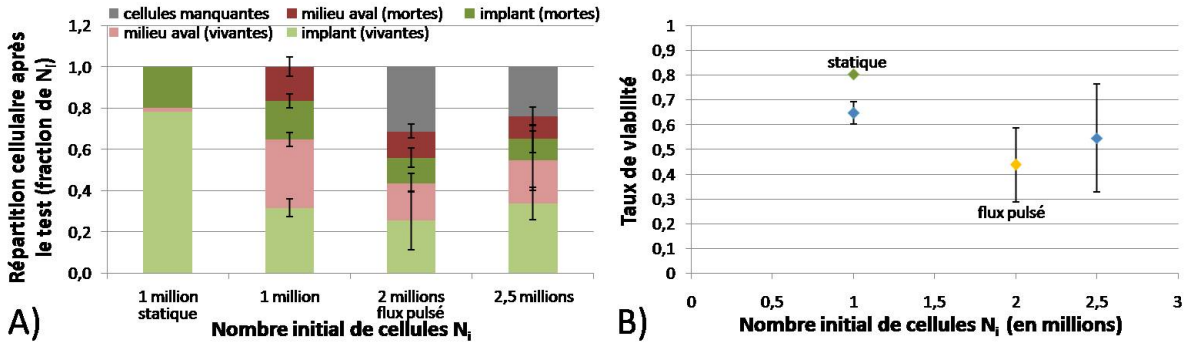



FIGURE 3.7 – Influence de la densité cellulaire sur la colonisation des biomatériaux. A) : Répartition des cellules au sein du montage (vitesse : $9.7 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$, distance perfusée $d_{fl}$ : $1.8$ cm). B) : Taux de viabilité des cellules. Les tests sont réalisés en flux continu, à l'exception de la densité cellulaire 2 millions, réalisée en flux pulsé (point jaune, voir tableau 3.3). Le protocole d'ensemencement statique est ajouté pour comparaison. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type des données mesurées.

Sur la figure 3.7.A, il est tout d'abord possible de remarquer que si, près de $80\%$ des cellules sont ensemencées avec le protocole statique, ce taux est inférieur à $40\%$ après application d'un écoulement. Ce résultat doit néanmoins être tempéré : il a en effet été montré que, dans le cas d'un ensemencement statique, les cellules se déposent en surface et ne pénètrent que très peu au sein de l'échantillon [267, 126], ce qui ne constitue pas un ensemencement satisfaisant. On peut d'ailleurs observer que, pour ce protocole, le nombre de cellules récupérées en aval de l'échantillon est très faible, ce que nous conforte dans cette analyse. En revanche, l'utilisation d'un écoulement fluide

semble permettre à une large fraction des cellules de traverser l'échantillon, phénomène *a priori* encourageant dans la perspective d'une colonisation en volume des implants.

Par ailleurs, on observe une augmentation importante de la mortalité cellulaire pour les échantillons ensemencés en présence d'un écoulement par rapport au protocole d'ensemencement statique, ce que confirme la figure 3.7.B. Le taux de viabilité semble également diminuer quand la quantité initiale de cellules augmente, même si cette tendance n'est pas statistiquement significative (voir l'analyse de sensibilité présentée dans l'annexe C). De plus, la variabilité des résultats est plus importante pour les échantillons à $2.5$ millions de cellules.

On peut également remarquer que, dans le cas des échantillons ensemencés avec cette dernière densité, une quantité non négligeable de cellules n'est pas retrouvée lors du comptage. Après nous être assurés qu'aucun défaut de protocole ne pouvait être à l'origine de ce phénomène (fuite, purge insuffisante en fin de manipulation, défaut d'injection), nous avons supposé pour la suite de l'étude que ces cellules manquantes étaient des cellules mortes, car détruites lors de l'application de l'écoulement. La présence importante de débris cellulaires dans la solution récupérée après le rinçage nous conforte d'ailleurs dans ce choix.

Il semble donc que les sollicitations physiques imposées aux cellules à travers cet écoulement les détériorent, et ce d'autant plus que la densité cellulaire initiale augmente. Nous avons alors cherché à déterminer quel était le ou les paramètre(s) (et donc le type de sollicitations) auxquels les cellules étaient les plus sensibles, et qui pouvai(en)t être à l'origine de cette forte mortalité.

Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé de nouveaux tests, en changeant uniquement la nature de l'écoulement (points jaunes sur la figure 3.7.B) : si la vitesse et la distance perfusée totale ne changent pas, nous avons cette fois imposé un écoulement pulsé (défini dans le tableau 3.3), changeant ainsi la nature du chargement mécanique appliqué aux cellules. Ces tests, réalisés avec une densité cellulaire initiale de $2$ millions de cellules par échantillon, donnent des résultats similaires à ceux obtenus précédemment avec $2.5$ millions de cellules. En effet, bien que le taux de viabilité des tests avec écoulement pulsé soit légèrement plus faible, cette différence n'est pas statistiquement significative, en raison principalement de la grande variabilité des résultats obtenus. La nature du chargement mécanique (continu ou pulsé) ne semble donc pas avoir d'influence notable ni sur la fraction de cellules ensemencée, ni sur le taux de viabilité cellulaire.

Intéressons-nous à présent aux autres paramètres de cette étude. Pour minimiser la variabilité

des résultats, les tests présentés par la suite ont été réalisés avec une densité cellulaire initiale d'un million de cellules par échantillon et un ensemencement à l'aide d'un écoulement continu.

### 3.2.2 Influence des autres paramètres

#### Distance perfusée

Faire varier la distance perfusée $d_{fl}$ – en modifiant la durée de l'écoulement – permet de mettre en évidence la présence éventuelle d'un phénomène de lavage, et donc d'une durée optimale d'écoulement. En effet, nous avons pu observer au paragraphe précédent que, sous l'action du fluide, une quantité importante de cellules est retrouvée dans la partie aval du montage. Si cette proportion augmente avec la durée d'écoulement, nous pourrons en déduire que les cellules, entraînées par le fluide, pénètrent l'échantillon, puis le traversent complètement. Il serait alors possible de déterminer une durée optimale d'écoulement, ou de mettre au point des cycles d'écoulement en allers-retours, pour maintenir les cellules au cœur de l'échantillon.

D'un point de vue physique, augmenter la durée du flux revient à moduler le travail transmis aux cellules sans modifier l'intensité de la force qui leur est appliquée. Un changement du taux de viabilité lié à ce paramètre nous indiquerait donc que l'énergie mécanique transmise aux cellules est suffisamment élevée pour compromettre leur bon fonctionnement.

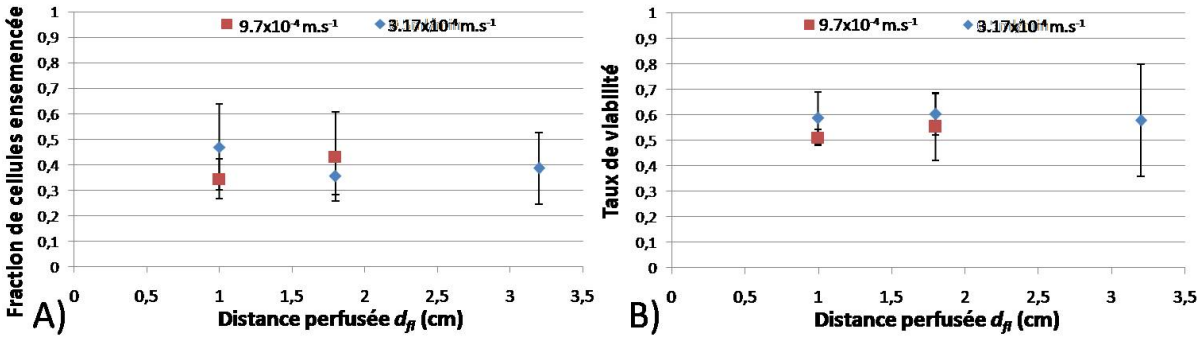



FIGURE 3.8 – Influence de la distance perfusée $d_{fl}$ sur la colonisation cellulaire du biomatériau. A) : Fraction de cellules ensemencée (vitesse : 3.17 et $9.7 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$, 1 million de cellules par échantillon). B) : Taux de viabilité des cellules. Les tests sont réalisés en flux continu, 30 minutes après l'injection des cellules dans le montage. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type des données mesurées.

Sur la figure 3.8, on a représenté les résultats obtenus en faisant varier la distance perfusée pour deux vitesses moyennes d'écoulement. Aucune tendance claire ne se dégage de ces données, que ce

soit à "haut" ou "bas" débit. Dans les plages de valeurs étudiées, ce paramètre ne semble donc pas influer sur le comportement cellulaire au sein des échantillons. De plus, l'absence d'évolution de la quantité de cellules ensemencées laisse présager une mauvaise pénétration dans le biomatériau. Ce point devra être confirmé par la réalisation de coupes histologiques présentées dans le paragraphe 3.3.

### Temps de pause

Au moment où elles pénètrent dans le dispositif, les cellules ont déjà subi de multiples facteurs de stress, physiques et chimiques. Elles ont en effet été soumises à une action enzymatique, puis centrifugées, et ont donc passé un certain temps à température ambiante (et non à $37^{\circ}C$), puis ont été injectées à l'aide d'une seringue. On peut alors se demander si l'augmentation de la mortalité observée après l'écoulement ne viendrait pas du stress supplémentaire que ce dernier occasionne et qui, même s'il est *a priori* non délétère pour les cellules, pourrait endommager une structure cellulaire déjà éprouvée. Nous avons donc essayé d'observer des temps de pause plus ou moins longs entre l'injection des cellules dans le dispositif et la mise en mouvement du fluide, pour limiter l'accumulation des sollicitations ressenties par ces dernières. Les résultats de ces tests sont présentés figure 3.9.

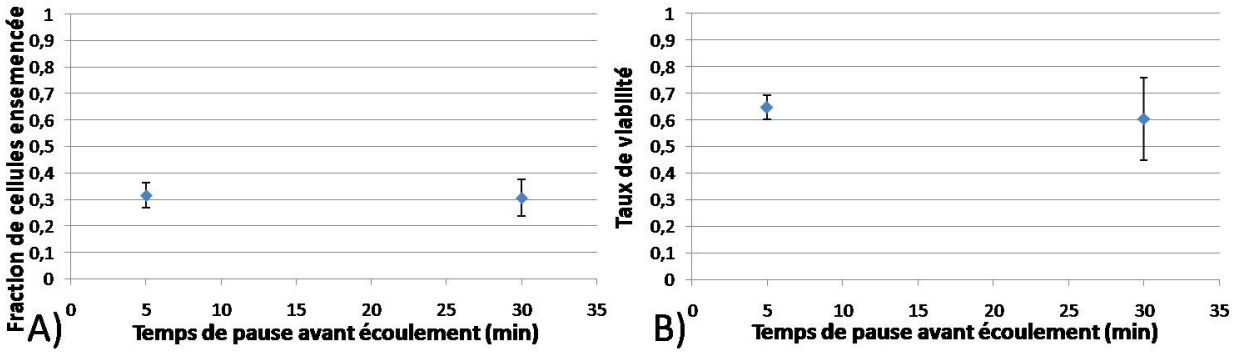



FIGURE 3.9 – Influence du temps de pause avant l'écoulement sur la colonisation. A) : Fraction de cellules ensemencées (vitesse : $9.7 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$, distance perfusée : $1.8$ cm, densité cellulaire : 1 million). B) : Taux de viabilité des cellules. Les tests sont réalisés en flux continu. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type des données mesurées.

Cette fois encore, aucune évolution n'est constatée en ce qui concerne la fraction de cellules ensemencées ou leur taux de viabilité. L'ensemencement cellulaire semble donc insensible à ce paramètre.

### Vitesse du fluide

Intéressons-nous enfin au dernier paramètre de cette étude : la vitesse moyenne d'écoulement du fluide $\overrightarrow{V_{in}}$, imposée en entrée du dispositif, qui est directement reliée aux efforts subis par les cellules. En effet, en reprenant la loi de Poiseuille, tous les autres paramètres étant des caractéristiques fixes du système, le débit – et donc la vitesse moyenne du fluide – sont directement proportionnels au gradient de pression existant au niveau de l'échantillon, et donc à la force de pression s'appliquant sur les cellules. Notons qu'au voisinage de ces dernières, les effets dus aux cisaillements locaux, qui nécessitent la connaissance du champ de vitesses local, s'ajoutent aux effets de pression. Ces efforts mécaniques sont susceptibles de déformer la membrane cellulaire. Au niveau des interconnexions des pores en particulier, en raison de l'augmentation locale de la vitesse d'une part, et de la présence des parois qui peuvent gêner le passage des cellules d'autre part, ces déformations deviennent plus importantes, et pourraient endommager la structure de la cellule [184]. Ce phénomène peut également être accentué en cas de bouchage partiel du pore, dû à une accumulation locale de cellules.

Pour déterminer l'impact de ces efforts de pression sur le comportement des cellules au sein du dispositif, nous avons donc choisi de faire varier la vitesse de perfusion $\overrightarrow{V_{in}}$ de 0 à $9.7 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$. D'après les travaux de Wendt et al. [267], ces valeurs se situent dans une zone *a priori* sans danger pour les cellules. Les résultats de ces tests sont présentés sur la figure 3.10.

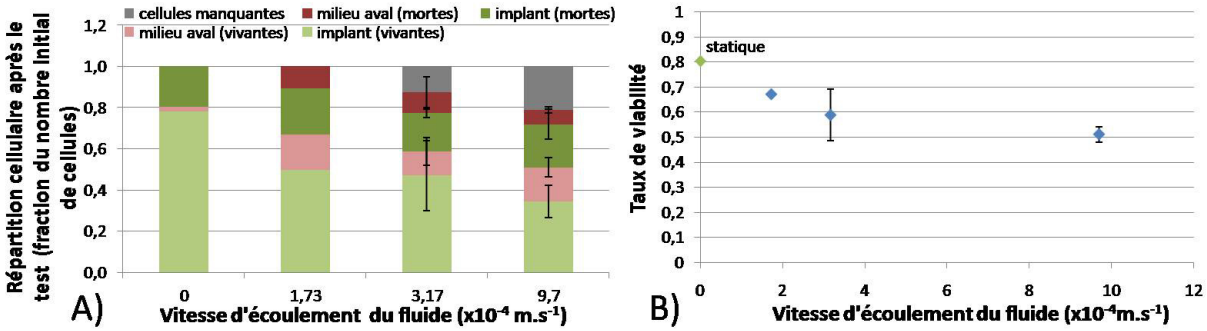



FIGURE 3.10 – Influence de la vitesse d'écoulement du fuide sur la colonisation. A) : Répartition des cellules au sein du dispositif (temps de pause : 30 min, distance perfusée : 1 cm, densité cellulaire : 1 million de cellules par échantillon). B) : Taux de viabilité des cellules. Les tests sont réalisés en flux continu. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type des données mesurées pour les vitesses de $3.17 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$ et $9.7 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$. Les tests à vitesse nulle et à $1.73 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$ ont été réalisés une fois chacun, pour comparaison.

La figure 3.10.A indique que la fraction de cellules ensemencée (cellules vivantes sur le bio-

matériau) décroît quand la vitesse du fluide augmente. Le taux de viabilité, visible sur la figure 3.10.B, suit la même tendance. De plus, pour les deux vitesses les plus élevées, une fraction non négligeable de cellules n'est pas retrouvée lors du comptage, comme c'était le cas pour les tests réalisés à densité cellulaire élevée (voir paragraphe 3.2.1).

Même si ces tendances ne sont pas statistiquement significatives (voir l'analyse de sensibilité présentée dans l'annexe C), elles semblent indiquer que les comportements cellulaires observés sont plus liés à l'intensité qu'aux aspects temporels (durée, nature du chargement) des sollicitations mécaniques auxquelles les cellules sont soumises.

Remarque : Notons tout de même que les vitesses d'écoulement imposées ici restent inférieures à celle utilisée lors du protocole de comptage des cellules ($5.77 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$). Or, aucune augmentation significative de la mortalité cellulaire n'a été observée lors des tests de validation de cette méthode de comptage (voir paragraphe 3.1.2). Ces résultats expérimentaux semblent donc surprenants. Néanmoins, au début de la réalisation d'un test d'ensemencement, les cellules se situent toutes au niveau de la face amont du biomatériau. Cette hausse de la mortalité pourrait donc être due à un encombrement important des pores situés au niveau de cette face, engendrant des efforts mécaniques locaux importants, dommageables pour les cellules. En tout état de cause, des tests complémentaires devraient être réalisés par la suite pour tenter d'expliquer ce phénomène. Rappelons que nous nous sommes déjà assurés à l'aide de tests additionnels que l'étape d'injection cellulaire n'est pas à l'origine de cette hausse de mortalité (voir paragraphe 3.2.1).

**Bilan**

Bien que les cellules soient soumises à des sollicitations mécaniques *a priori* en-dessous des seuils qui leur sont dommageables [267, 126], on observe une forte augmentation de leur taux de mortalité au cours du protocole d'ensemencement. De plus, malgré la présence de cellules dans la partie aval du dispositif, la fraction de cellules ensemencée reste très faible. Pour tenter de comprendre ce qui se passe au niveau des échantillons, nous avons réalisé des coupes histologiques après ensemencement. Leur observation, en nous renseignant sur la disposition des cellules au sein des biomatériaux, devrait nous fournir une clé de compréhension supplémentaire concernant ce comportement cellulaire étonnant.

## 3.3 Répartition au sein de l'implant : influence de la structure

La répartition des cellules au sein de l'implant est un critère important de l'évaluation de la qualité de l'ensemencement. En effet, cette répartition doit être la plus homogène possible en volume pour permettre un développement harmonieux du tissu, en supprimant les "zones mortes" et les pics de concentration cellulaire, dommageables à leur survie [30].

Nous avons donc, pour chaque combinaison de paramètres, inclus deux échantillons dans une résine en poly(methyl methacrylate) (PMMA), après déshydratation complète de ces derniers dans l'éthanol puis dans le xylène. Une fois la réaction de polymérisation terminée, des coupes de $400$ $\mu$m d'épaisseur ont été réalisées dans le sens de la hauteur des implants (8 coupes par échantillon), puis colorées successivement avec du bleu de Stevenel et de la picro-fushine selon van Gieson, le premier donnant une teinte bleue au cellules, et la seconde colorant le biomatériau en rose.

### 3.3.1 Variabilité des échantillons

Sur la figure 3.11, on a regroupé quatre coupes histologiques issues d'échantillons différents. Il apparaît alors qu'en dépit des caractéristiques théoriques présentées au paragraphe 3.1.1, la structure poreuse des biomatériaux est très variable, en raison notamment de la présence de lacunes macroscopiques (figure 3.11.B) ou d'accumulation de matière au cœur du biomatériau (figure 3.11.C). Sur certains échantillons, des pores fermés de plusieurs millimètres ont également été observés. De plus, parmi les implants qui présentent une structure globale plus régulière, on constate dans certains cas une accumulation de matrice solide au niveau des parois du cylindre, qui réduit fortement la porosité locale, et freine alors l'entrée des cellules au sein du biomatériau (figure 3.11.A). Ces différences de structure ont d'ailleurs pu être observées dès la réalisation des tests, certains échantillons flottant dans le milieu de culture lors de leur phase d'humidification préalable, alors que la plupart coulent dès qu'ils sont plongés dans le liquide.

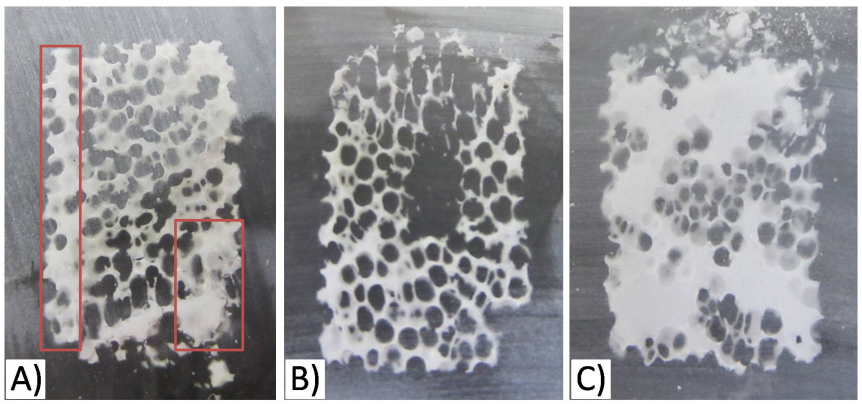



FIGURE 3.11 – Différents types de structures rencontrés. A) : Accumulation de solide au niveau des parois (signalée par les cadres rouges) B) : Lacune macroscopique au cœur de l'implant. C) : Accumulation de solide au cœur de l'implant.

Ces irrégularités de structure jouent un rôle majeur dans la possible progression des cellules au sein des échantillons, car elles rendent leur circulation plus difficile. De plus, elles occasionnent l'apparition de zones mortes (accumulation de matière, porosité fermée), et peuvent avoir des conséquences non négligeables sur la tenue mécanique des biomatériaux.

En outre, elles constituent un facteur clé, mais inconnu lors de la réalisation du test, dans le succès des protocoles d'ensemencement mis en place. En effet, un échantillon semblable à celui de la figure 3.11.C, dont la structure compromet la circulation des cellules, pourra difficilement être ensemencé de façon satisfaisante, quel que soit l'écoulement utilisé. De même, un biomatériau présentant une porosité réduite au niveau de la face supérieure (dirigée vers l'entrée du dispositif) sera plus difficile à coloniser, et les cellules ayant pénétré dans l'échantillon auront subi des efforts plus prononcés dus au rétrécissement du passage disponible, ce qui peut les endommager.

Pour étudier l'impact des paramètres d'écoulement au cœur de cette étude sur la répartition des cellules au sein des implants, nous nous sommes donc restreints aux échantillons qui présentaient une structure poreuse globale "régulière", *i.e.* sans défaut macroscopique (accumulation de matière, lacune, paroi obstruée).

### 3.3.2 Répartition des cellules

Après observation, il apparaît que la variation des différents paramètres ne permet pas d'obtenir une évolution visible de la répartition des cellules au sein des échantillons, qui présentent tous des

distributions cellulaires similaires à celle présentée dans les figures 3.12 et 3.13. Ces dernières correspondent à l'observation en coupe d'un biomatériau poreux ensemencé avec $1$ million de cellules et un écoulement continu de vitesse moyenne $3.17 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$ effectué $30$ minutes après l'injection de cellules et maintenu sur une distance de $3.2$ cm. Le protocole d'inclusion dans une résine PMMA est quant à lui commencé $3$ heures après le test d'ensemencement. Une deuxième lame, issue d'un test réalisé avec la même combinaison de paramètres sur un autre échantillon est présentée dans l'annexe D pour comparaison.

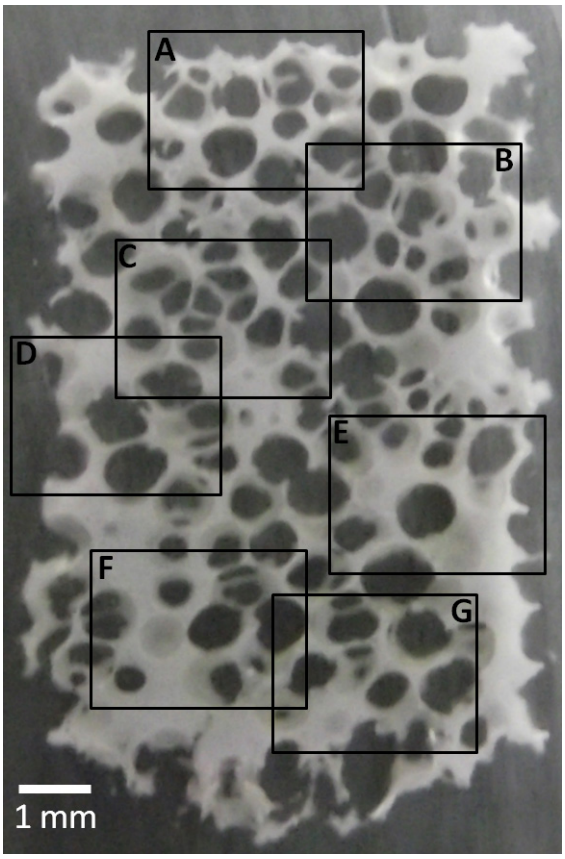
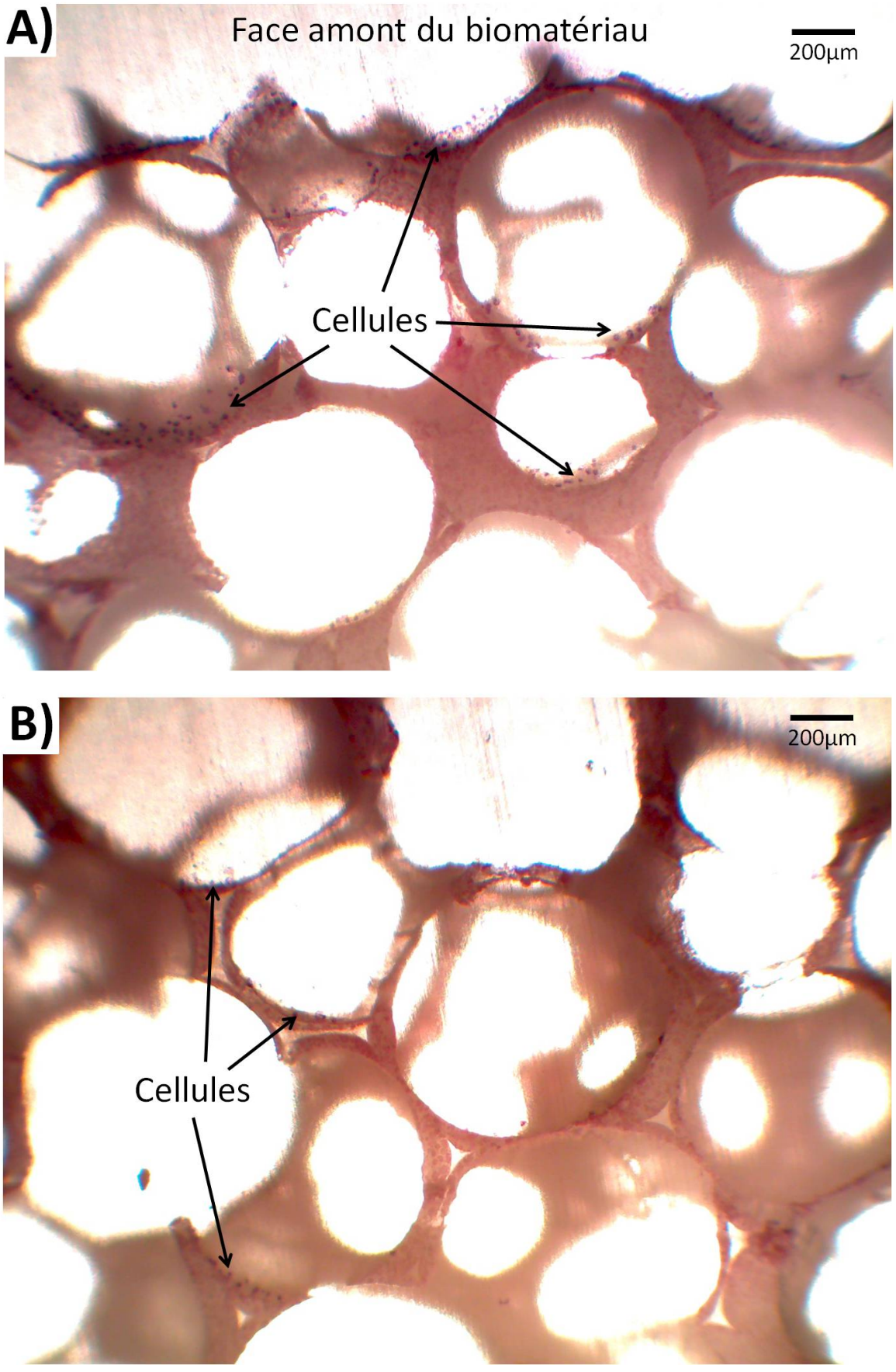
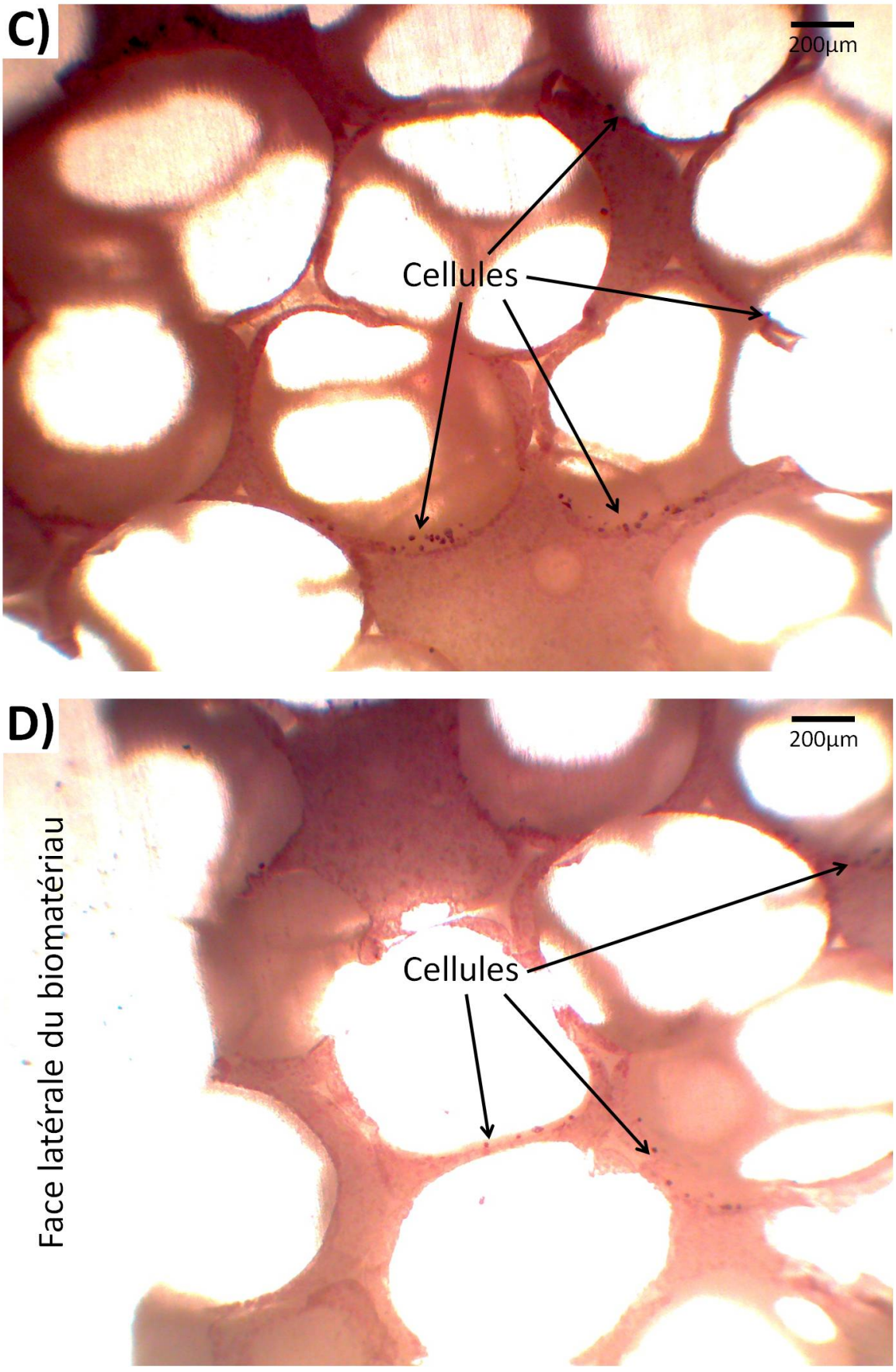
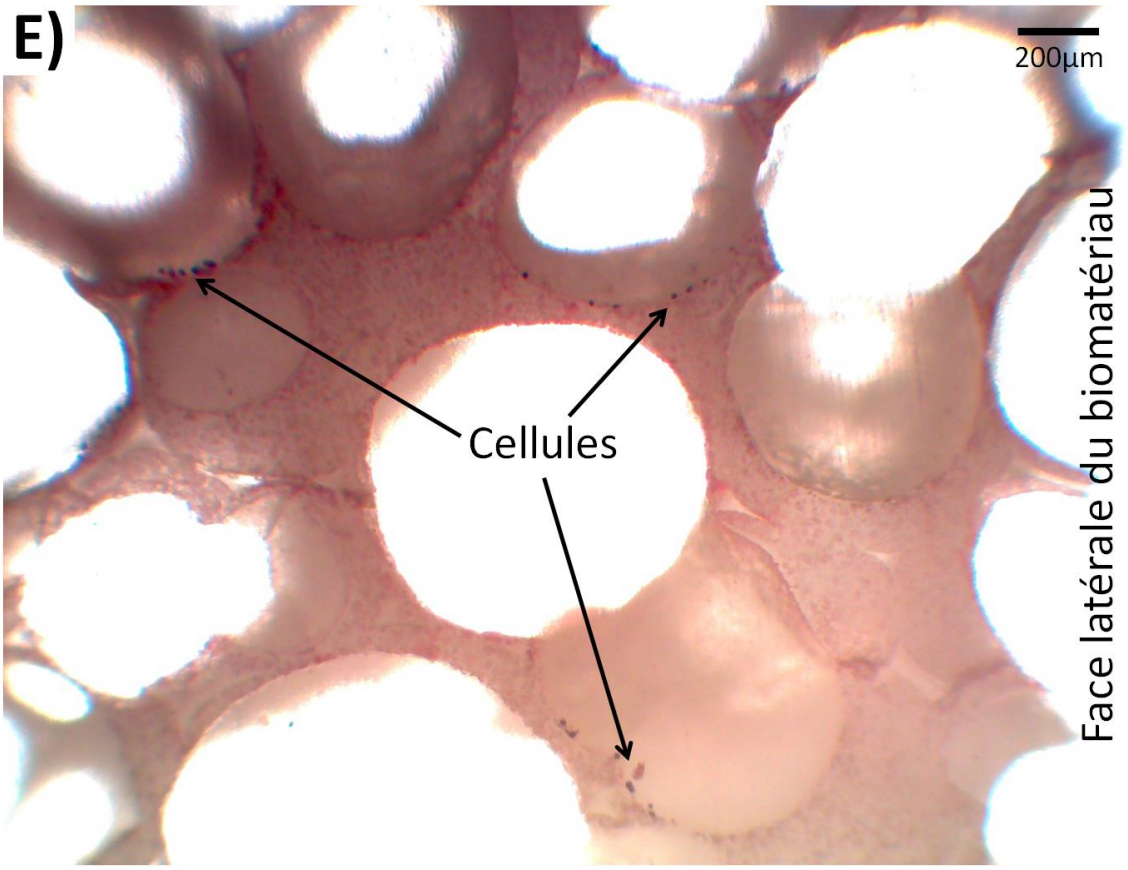
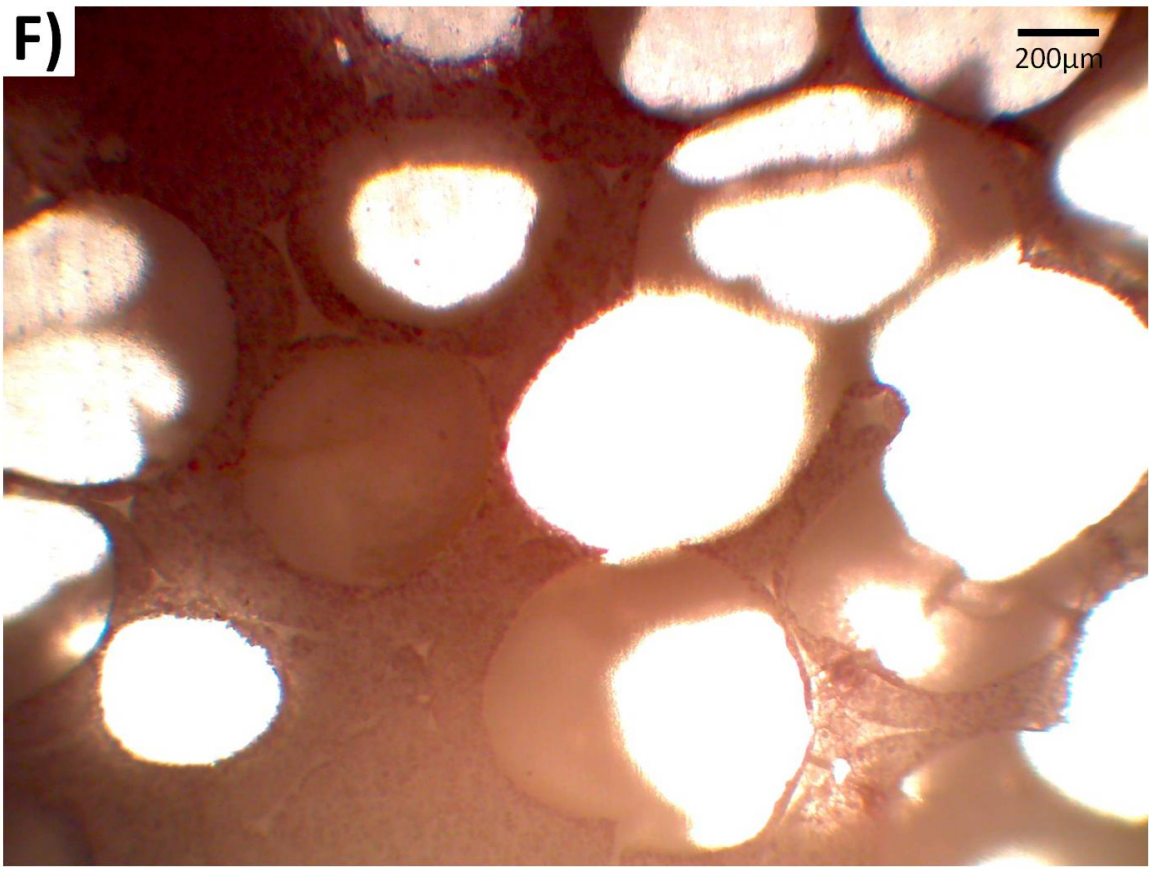



FIGURE 3.12 – Répartition des cellules au sein d'un échantillon après ensemencement cellulaire. Vue en coupe de l'échantillon étudié. L'écoulement du fluide a été effectué du haut vers le bas de la figure. Les rectangles représentent les zones correspondant aux agrandissements présentés dans les figures 3.13.A à 3.13.G.


A)
Face amont du biomatériau
200µm
Cellules
B)
200µm
Cellules


C)
200µm
Cellules
D)
200µm
Face latérale du biomatériau
Cellules


E)
200µm
Cellules
Face latérale du biomatériau


F)
200µm

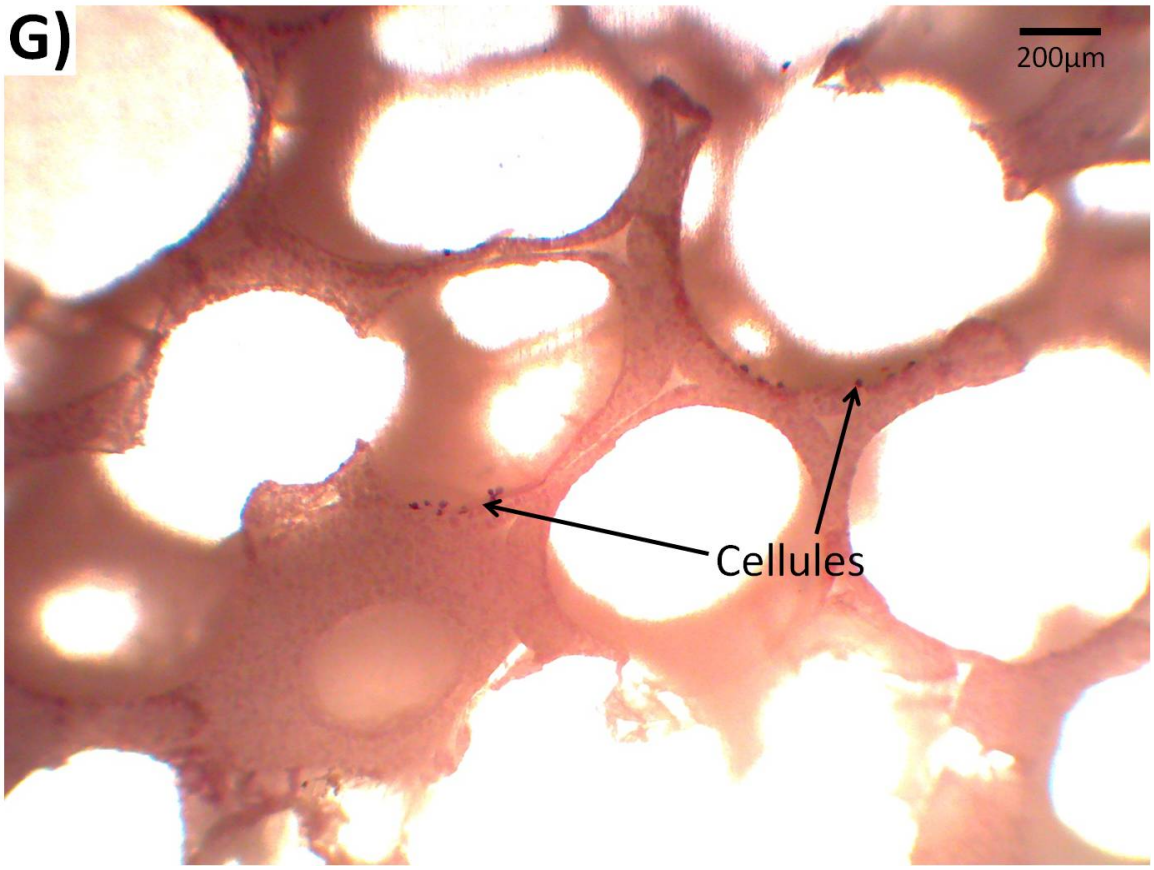



FIGURE 3.13 – Coupe histologique d'un échantillon ensemencé dans un bioréacteur à perfusion. Observation au microscope optique après coloration au bleu de Stevenel et à la picro-fushine selon van Gieson. Les cellules sont teintées en bleu et indiquées par des flèches.

On peut alors observer sur les figures 3.12 et 3.13 que la majorité des cellules restent au niveau de la face amont du biomatériau, ou au niveau des deux premières rangées de pores (figure 3.13.A). Le cœur de l'échantillon reste lui peu colonisé (figures 3.13.B et 3.13.D), même si quelques cellules y sont présentes, notamment dans les zones situées en aval de "grandes" interconnexions (figure 3.13.C) ou près des faces latérales de l'implant (figure 3.13.E). Enfin, des zones importantes ne contiennent aucune cellule (figure 3.13.F), et ce d'autant plus qu'on s'approche de la face aval de l'échantillon.

Cette répartition semble indiquer que les sollicitations mécaniques imposées par l'écoulement sont insuffisantes pour entraîner les cellules en masse au cœur du biomatériau, malgré une taille de pores *a priori* suffisante pour permettre la traversée des cellules.

**Bilan**

Les tests réalisés montrent que les écoulements testés ne permettent pas aux cellules de pénétrer en masse dans les biomatériaux. Paradoxalement, bien que l'intensité des sollicitations mécaniques utilisées soit *a priori* bien inférieure au seuil d'endommagement des cellules, le taux de viabilité de ces dernières chute après l'écoulement, et ce d'autant plus que la vitesse moyenne du fluide augmente.

Ces résultats surprenants pourraient être dus à la structure très variable des échantillons disponibles. La présence de grumeaux, en particulier, qu'ils soient dans le cœur de l'implant ou situés près des parois, gêne la progression des cellules et pourrait entraîner l'apparition de zones de forts cisaillements, expliquant cette chute brutale de la viabilité cellulaire. De plus, ils interdisent l'accès à la partie de l'échantillon située en aval.

A l'heure actuelle, ces implants paraissent donc être mal adaptés à une colonisation cellulaire homogène en volume, principalement en raison de leur structure. Il serait donc intéressant de pouvoir développer des biomatériaux poreux à la structure plus contrôlée, et plus adaptée au passage des cellules.

### 3.3.3 Les limites des protocoles d'ensemencement

De nombreuses études visant à améliorer les protocoles d'ensemencement classiques d'implants ostéo-articulaires et les protocoles de culture associés sont disponibles dans la littérature. Elles font généralement appel à un ou plusieurs des trois types cellulaires suivants : cellules souches mésenchymateuses, lignée cellulaire ostéoblastique (ostéoblastes ou l'un de leurs précurseurs) et lignée cellulaire chondrocytaire (chondrocytes ou l'un de leurs précurseurs). En revanche, les implants utilisés sont extrêmement variés, aussi bien en terme de composition chimique qu'en terme de forme, de taille et de structure microscopique. Le tableau 3.4 présente quelques exemples de protocoles publiés ces dernières années.

| Ref. | Cellules | Biomatériau | Protocole | Remarques |
|---|---|---|---|---|
| Holtorf et al. [110] | CSM de rats | 60% HAP, 40% $\beta$TCP<br>porosité 90%<br>disques ($h = 8$ mm, $D = 8$ mm) | ensemencement : aspiration<br>culture : flux *vs* statique | faible tenue mécanique de l'implant |
| Scaglione et al. [232] | CSM humaines | HAP<br>porosité 80%<br>disques ($h = 4$ mm, $D = 8$ mm) | ensemencement : statique *vs* flux<br>culture : statique | homogénéité après 3 jours : $\leq 40\%$<br>homogénéité après 14 jours : $\leq 70\%$ |
| Li et al. [155] | particules fluorescentes | PCL<br>porosité 90%<br>blocs ($h = 6$ mm,<br>$S = 2 \times 5$ mm) | ensemencement : statique avec ondes acoustiques | répartition homogène sur 3 mm, puis gradient de concentration particulaire |
| Xu et al. [276] | CSM ovines | $\beta$TCP<br>tubes avec fond<br>($h = 30$ mm, $D_i = 3$ mm,<br>$D_e = 14$ mm) | ensemencement : aspiration<br>culture : flux | gradient de densité cellulaire du centre vers l'extérieur du tube |
| Alvarez-Barreto et al. [7] | MC3T3[(1)] | mousse polystyrène<br>porosité 95%<br>disques ($h = 3$ mm, $D = 8$ mm) | ensemencement : statique *vs* flux | homogénéité : 40% (statique) - 80% (flux), mais faible quantité de cellules ensemencée |
| Koch et al. [136] | MG63[(2)] | PLA<br>porosité 95.7%<br>disques ($h = 12$ mm,<br>$D = 6$ mm) | ensemencement : flux | homogénéité : $\leq 50\%$<br>faible tenue mécanique |
| Buckley and OKelly [27] | MC3T3[(1)] | HAP<br>canaux macroscopiques<br>disques ($h = 4$ mm, $D = 5$ mm) | culture : statique *vs* flux | statique : cellules en périphérie<br>flux : colonisation en volume |
| Melchels et al. [186] | CSM immortelles | PDLLA-diméthacrylate<br>porosité 67%<br>disques ($h = 5$ mm, $D = 8$ mm) | culture : statique *vs* flux | comparaison structure alvéolaire *vs* giroïde : meilleure homogénéité pour la deuxième |

TABLE 3.4 – Différents biomatériaux utilisés dans le développement *in vitro* d'organoïdes destinés à la réparation tissulaire ostéo-articulaire. Des revues plus détaillées sur ce sujet peuvent être trouvées dans Bueno et al. [30] et Wendt et al. [268]. $h$ : hauteur, $D$ : diamètre, $D_i$ : diamètre intérieur, $D_e$ : diamètre extérieur, $S$ : section droite. [(1)]MC3T3 : Précurseurs ostéoblastiques de souris immortalisés. [(2)]MG63 : Cellules osseuses cancéreuses humaines.

Si la nature chimique des implants est fortement variable d'une étude à l'autre, on peut en revanche distinguer deux types de morphologie des biomatériaux utilisés : les échantillons de taille moyenne, dont la hauteur ne dépasse pas $5$ mm, de porosité moyenne inférieure à $80\%$, et ceux de taille plus importante, dont la porosité est supérieure à $90\%$.

Pour les premiers, la principale difficulté consiste à obtenir un ensemencement puis un développement cellulaires homogènes en volume. En effet, on observe généralement une baisse sensible de la densité de cellules ensemencées dès que l'on s'éloigne de la face par laquelle les cellules entrent dans l'échantillon [232, 155, 276, 27]. Si l'action d'un flux fluide permet d'améliorer cet aspect, les taux d'homogénéité atteints sont encore largement insatisfaisants dans la plupart des cas. Bien que ce gradient puisse en partie être compensé en début de culture par la migration des cellules, qui ont une tendance naturelle à occuper au maximum l'espace dont elles disposent, la deuxième difficulté réside dans la nécessité d'assurer un environnement physico-chimique stable et favorable au développement cellulaire dans l'ensemble de l'échantillon. Cette fois encore, le cœur de l'implant étant difficile à atteindre, on constate une diminution sensible de la population cellulaire dans les zones profondes des échantillons au fil du temps, ce qui conduit à une formation tissulaire concentrée à la périphérie des implants. Cette impossibilité d'assurer un apport de fluide suffisant à des profondeurs supérieures à $2-3$ mm constitue la principale raison des dimensions relativement faibles des échantillons utilisés : leur hauteur (ou épaisseur) dépasse rarement $5$ mm, alors que la taille des défauts critiques auxquels ils sont destinés est de l'ordre de plusieurs centimètres (voir paragraphe 1.3.2).

Les échantillons appartenant à la deuxième catégorie sont eux dans l'ensemble plus volumineux, et semblent plus favorables à une colonisation et une prolifération cellulaires homogènes en volume, grâce notamment à leur forte porosité [7, 136]. Mais celle-ci détériore grandement leur tenue mécanique, ce qui pose un problème majeur dans le cadre d'applications à visées ostéo-articulaires où les tissus sont soumis à de fortes contraintes.

Pour améliorer la pénétration des cellules au sein des implants sans dégrader les propriétés mécaniques de ces derniers, optimiser la forme et la taille des pores semble être une solution prometteuse. En effet, les travaux de Melchels et al. [186] montrent qu'en comparaison à une structure alvéolaire, une structure poreuse ordonnée permet d'améliorer de façon importante l'homogénéité des ensemencements réalisés, même lors de l'utilisation d'un protocole statique. De

plus, les structures alvéolaires ou de mousse étant moins régulières, la distribution spatiale des efforts (et notamment du cisaillement) y est plus difficilement contrôlable, d'où l'apparition de pics d'efforts locaux, qui peuvent endommager les cellules. Par ailleurs, la morphologie de l'implant et les comportements cellulaires évoluant au cours du temps (adhésion puis prolifération, production de matrice, etc), il est important de mettre au point une structure poreuse adaptée aux différentes étapes du développement des organoïdes.

## 3.4 Conclusion

L'étude présentée dans ce chapitre a permis de mettre au point un dispositif expérimental permettant de réaliser l'ensemencement cellulaire de substituts osseux poreux de grande taille. Le protocole associé permet d'évaluer le nombre de cellules ensemencées, ainsi que leur taux de viabilité et leur répartition au sein de l'échantillon.

L'objectif des tests réalisés était de caractériser la capacité de substituts osseux commercialisés à être colonisés en volume, dans le cadre de la mise au point d'implants issus de l'ingénierie tissulaire osseuse. Le protocole développé a montré qu'il est difficile d'obtenir un ensemencement cellulaire satisfaisant pour ce type de biomatériaux commercialisés. En effet, les cellules pénètrent peu dans l'échantillon malgré les sollicitations mécaniques appliquées (perfusion de fluide), et restent au niveau de la face amont de ce dernier. De plus, la fraction de cellules greffée reste faible et, malgré l'utilisation de sollicitations d'intensité *a priori* bien inférieure au seuil létal, le taux de viabilité cellulaire diminue parfois fortement après ensemencement (voir annexe B).

La réalisation de coupes histologiques a par ailleurs permis de mettre en évidence une grande variabilité dans la structure interne des échantillons, qui pourrait expliquer en partie le caractère surprenant des résultats expérimentaux. Plus généralement, ces résultats, comme ceux des études récentes disponibles dans la littérature, illustrent la nécessité de mettre au point des substituts osseux à la structure poreuse contrôlée, adaptée aussi bien au passage des cellules lors de l'ensemencement qu'au transport de facteurs chimiques au cours des différentes étapes de développement cellulaire et tissulaire *in vitro* puis *in vivo*.

Une telle conception nécessite une évaluation précise de l'évolution de différents paramètres physico-chimiques en fonction de la forme et de la taille des pores. L'utilisation d'un modèle

numérique regroupant les principaux phénomènes à contrôler permettrait donc d'améliorer puis d'optimiser la morphologie des pores à moindre coût, et d'une manière beaucoup plus précise qu'une méthode expérimentale d'essais et erreurs [268]. C'est à cet aspect que nous allons nous intéresser dans le chapitre suivant.

# Chapitre 4

# Etude numérique des étapes d'ensemencement et de prolifération cellulaires

LES phénomènes de transport jouent un rôle déterminant dans le développement d'implants issus de l'ingénierie tissulaire, aussi bien lors de l'étape de l'ensemencement cellulaire des futurs implants (voir chapitre 3) que lors de la mise en culture des organoïdes ainsi obtenus (voir chapitre 1). Lors de la mise au point de nouveaux biomatériaux poreux, il est donc important de prendre en compte les besoins spécifiques des différentes étapes du développement des futurs implants, de leur création à leur insertion sur le site de la lésion. Pendant l'ensemencement, la priorité est de favoriser la circulation des cellules au sein de l'implant, pour obtenir une colonisation homogène en volume (voir chapitre 3). Il est suivi de la phase de mise en culture de l'échantillon (voir figure 1.6), qui regroupe plusieurs étapes, caractérisées par différents types d'activité cellulaire : après une phase de latence (entre 24h et 48h) pendant laquelle cette dernière est peu visible, on observe une phase de forte prolifération cellulaire, jusqu'à l'obtention de la densité cellulaire finale de l'implant (au bout de quelques jours). Puis, une troisième phase, consacrée à la production de matrice extracellulaire et à la différenciation des cellules, permet de constituer une matrice organique, qui servira de support à la création du nouveau tissu fonctionnel [38, 139]. Durant l'ensemble de ces étapes de culture, la principale difficulté consiste à maintenir des conditions physico-chimiques satisfaisantes en tout point de l'implant. Il faut ainsi apporter

suffisamment d'oxygène et de nutriments pour assurer la survie des cellules, mais aussi évacuer les déchets issus de l'activité cellulaire. Il ne s'agit donc plus cette fois uniquement de transport de cellules, mais aussi de celui d'espèces chimiques.

La réussite d'un protocole de développement d'ingénierie tissulaire est ainsi dépendante de l'action combinée de nombreux phénomènes physico-chimiques. Il peut alors être difficile d'identifier précisément le rôle tenu par chacun de ces phénomènes, qui ne sont pas toujours indépendants, à partir de résultats expérimentaux seuls. L'utilisation de modèles numériques se révèle alors être un outil précieux, en permettant d'isoler les différentes actions physico-chimiques influençant le développement des implants souhaités, afin de mieux comprendre l'impact de chacune d'entre elles sur l'évolution des échantillons. En les couplant à des essais expérimentaux, il est alors possible d'identifier, puis de corriger, les facteurs limitants du protocole étudié [270]. Parmi les nombreuses études *in silico* réalisées dans le cadre de l'ingénierie ostéo-articulaire, on peut distinguer, de manière non exhaustive, trois catégories de modèles ciblant le comportement cellulaire au cours de la phase de culture des organoïdes : les modèles macroscopiques de croissance de la biomasse (phase organique comprenant les cellules et leur matrice extracellulaire), les études s'appuyant sur la répartition du taux de cisaillement au sein de l'échantillon, et les modèles centrés sur les interactions entre cellules.

**Modèles macroscopiques de croissance de la biomasse** Ils permettent d'étudier l'évolution globale d'un organoïde au sein d'un bioréacteur donné (généralement à perfusion). Il s'agit de modèles réalisés à l'échelle de l'implant entier, qui permettent d'évaluer le taux de production de matrice extracellulaire (MEC) en fonction des valeurs moyennes de la concentration en oxygène [38] et du taux de cisaillement [228, 45, 196] au sein de l'échantillon. Ils sont parfois couplés à des modèles réalisés à l'échelle du pore [45, 38]. Dans ce cas, le passage de la micro-échelle (pore) à la macro-échelle (échantillon) se fait soit par prise de moyenne volumique [45], soit en utilisant un modèle de Darcy et en intégrant les modifications survenues à la petite échelle dans la perméabilité du solide poreux considéré [38]. Si ces modèles permettent de comparer différents écoulements [228, 38] ou différentes géométries [45], ils ne prennent pas en compte les variations locales possibles de l'environnement physico-chimique. En effet, le taux de cisaillement peut varier très fortement localement pour certaines géométries [186], et un gradient de concentration en

oxygène est généralement observé entre la surface et le cœur de l'échantillon, ce qui peut entraîner un développement hétérogène, non souhaitable, du tissu en formation.

**Répartition du taux de cisaillement au sein de l'échantillon** Les modèles de cette deuxième catégorie s'appuient eux uniquement sur les sollicitations mécaniques générées par le fluide au sein du biomatériau, pour évaluer la capacité de ce dernier à favoriser le développement d'un tissu donné. L'écoulement du fluide à travers l'implant peut ainsi être simulé à l'aide d'une méthode numérique (résolution de l'équation de Navier-Stokes), avant de réaliser une cartographie du taux de cisaillement généré au niveau des parois de l'échantillon. En s'appuyant sur des essais expérimentaux, il est alors possible d'identifier l'impact de ce dernier sur le taux de prolifération cellulaire [276], et donc d'évaluer la capacité de différentes géométries à encourager un développement tissulaire uniforme en volume. Il existe également une correspondance entre la valeur du taux de cisaillement et la nature du tissu formé (os, cartilage, tissu fibreux) par différenciation des cellules souches. Ce type de modèle permet donc d'identifier, en fonction de la géométrie des pores de l'échantillon étudié, les plages de débit de fluide à respecter pour obtenir le tissu souhaité [205]. Néanmoins, l'environnement chimique de l'organoïde, qui constitue l'un des principaux facteurs limitants lors de la culture d'implants de grande taille (voir chapitre 3), n'est cette fois pas pris en compte.

**Modèles centrés sur les interactions entre cellules** Enfin, les modèles de cette troisième catégorie, construits à l'échelle de la cellule, visent à prédire le développement d'une population cellulaire à partir des interactions entre cellules (collisions, répulsion), de l'incapacité de ces dernières à mener deux types d'activités simultanément (migration, prolifération, différenciation) et de la durée des cycles de mitose [166, 42]. Ces modèles ne prennent en revanche pas en compte les caractéristiques du bioréacteur dans lequel se situent les cellules, l'environnement physico-chimique de ces dernières n'étant dans ce cas représenté que par les forces de répulsions internes à la couche cellulaire [166, 42] et la diffusion de glucose et d'oxygène au sein de la population (ou agrégat) considérée [91].

Ces études se concentrent donc généralement sur une seule étape du développement de l'organoïde considéré (prolifération ou production de MEC). De plus, les différents phénomènes à l'ori-

gine du développement de l'échantillon sont soit traités à l'échelle macroscopique (premier type de modèles), négligeant ainsi les variations, parfois importantes, existant d'un pore à l'autre, soit traités séparément (deuxième type de modèles). Or, dans le cadre de la mise au point de nouvelles structures poreuses destinées à l'ingénierie ostéo-articulaire, il serait utile de pouvoir prendre en compte les différentes étapes du développement du futur implant, de l'ensemencement cellulaire à son implantation sur le site de lésion, ainsi que les principaux phénomènes physico-chimiques entrant en jeu dans la réussite de ce type de protocoles, afin d'obtenir un cahier des charges précis quant au design d'une structure poreuse optimale.

L'objectif de ce chapitre est donc de proposer un premier modèle, permettant de simuler les étapes d'ensemencement et de prolifération cellulaire (voir figure 4.1), qui devra être par la suite complété pour prendre en compte, par exemple, les phases de production de matrice extracellulaire (dont la dynamique n'est pas étudiée ici, seul l'encombrement progressif des pores qui en résulte étant considéré) et de structuration du tissu, phases déterminantes en fin de culture des échantillons (voir chapitre 1). Ce modèle devra permettre d'évaluer le comportement cellulaire (adhésion, détachement, prolifération) au niveau de chaque pore, pour rendre compte du caractère homogène ou non du développement de l'implant étudié, et mettre ainsi en évidence l'influence de l'agencement structurel des pores. Il s'appuiera pour cela sur les estimations du taux de cisaillement généré par l'écoulement du fluide à travers l'échantillon et des concentrations en oxygène, molécule de petite taille, et en glucose, molécule de taille plus conséquente prise comme nutriment "modèle". La figure 4.1 résume la portée de notre modèle au sein d'un processus complet de culture d'un organoïde.

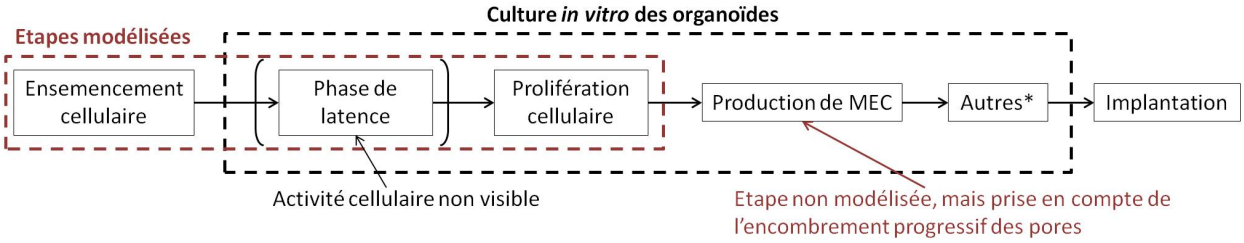



FIGURE 4.1 – Etapes du développement d'un implant issu de l'ingénierie tissulaire prises en compte dans cette étude. *Autres étapes du processus de développement *in vitro* des organoïdes (voir chapitre 1).

Pour cela, un nouveau modèle est proposé dans la première partie de ce chapitre. La deuxième

partie est ensuite consacrée à la résolution numérique du problème ainsi formulé, avant d'exposer les résultats obtenus après simulation numérique pour les étapes d'ensemencement et de prolifération cellulaire dans les parties 3 et 4, puis de proposer des pistes d'études dans une dernière partie.

## 4.1 Modèle proposé

Pour décrire l'évolution des cellules au sein d'un biomatériau poreux, le modèle proposé dans ce chapitre peut être appréhendé sous trois aspects : la simulation de l'écoulement du fluide au sein d'une structure poreuse (détermination des champ des vitesses et de pression, puis des taux de cisaillement correspondants au niveau des parois des pores) ; l'étude du transport des espèces chimiques étudiées (oxygène et glucose) ; et la réponse cellulaire aux paramètres environnementaux ainsi déterminés (adhésion, prolifération).

En raison de sa faible durée (inférieure à une minute), l'étape d'ensemencement peut être considérée comme indépendante des phénomènes de transport chimique. Ainsi, seuls les paramètres d'écoulement du fluide, macroscopiquement unidirectionnel selon une direction notée $\overrightarrow{e_1}$, seront donc à prendre en compte pour cette étape. En revanche, la prolifération cellulaire dépend des trois paramètres expérimentaux étudiés : la norme $\tau$ du vecteur taux de cisaillement, et les concentrations locales en oxygène et en glucose $C_{ox}$ et $C_{glu}$. Notons que, dans cette première approche, les mécanismes de mort cellulaire ne sont pas pris en compte.

### 4.1.1 Configuration géométrique

L'objectif du modèle présenté dans ce chapitre est de dégager les paramètres géométriques et physiques déterminants dans la mise au point de nouveaux substrats poreux destinés à l'ingénierie tissulaire osseuse. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser comme configuration géométrique de référence une structure alvéolaire, semblable à celle des échantillons utilisés lors des tests expérimentaux présentés au chapitre 3 (voir figure 4.2).

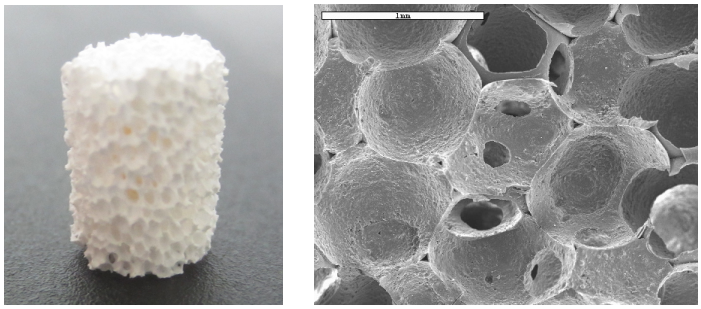


FIGURE 4.2 – Biomatériau considéré lors de la construction du modèle présenté dans ce chapitre. Vue d'ensemble de l'échantillon (figure de gauche), et observation de sa structure obtenue par microscopie électronique à balayage (figure de droite). La barre blanche représente 1 mm.

La géométrie utilisée lors de la construction de notre modèle consiste donc en une représentation idéalisée de cette structure, dans laquelle le domaine fluide est composé d'un ensemble de sphères de $800$ $\mu$m de diamètre, reliées par des connexions de $100$ $\mu$m de diamètre. Cette géométrie, qui correspond à une partie de l'échantillon, sera présentée plus en détail au paragraphe 4.2.1 (voir figure 4.7).

### 4.1.2 Ecoulement du fluide

Nous nous intéressons ici au cas d'un bioréacteur à perfusion, où l'utilisation d'une pompe contrôle la traversée du biomatériau par un fluide aqueux (voir paragraphe 1.4.4). Ce dernier est supposé newtonien et incompressible, de masse volumique $\rho_f = 10^3$ kg.m$^{-3}$ et de viscosité dynamique $\mu_f = 6 \times 10^{-4}$ Pa.s (à $37°C$). La modification éventuelle de la viscosité du fluide liée à la présence des cellules et de la MEC n'est donc pas prise en compte dans ce modèle. De plus, l'injection des cellules se fait une fois la chambre d'écoulement saturée et le régime stationnaire de l'écoulement établi. Le site d'injection est situé suffisamment loin du biomatériau pour que la perturbation de l'écoulement liée à l'injection soit dissipée au moment où le volume de fluide contenant les cellules atteint ce dernier.

**Equation de conservation de la quantité de mouvement du fluide** Au sein des pores, l'équation de Navier-Stokes stationnaire peut être utilisée pour décrire l'écoulement du fluide selon

$$\rho_f(\overrightarrow{v}.\nabla)\overrightarrow{v} = -\nabla P + \mu_f \nabla.\overrightarrow{v} \tag{4.1}$$

avec $\overrightarrow{v}$ la vitesse du fluide, $P$ le champ de pression. La condition d'incompressibilité s'écrit

$$\nabla . \overrightarrow{v} = 0 \tag{4.2}$$

Les pores du biomatériau considéré étant de l'ordre du millimètre ($R_p = 400\ \mu$m) et les vitesses moyennes imposées au fluide $V_{in}$ restant inférieures à $10^{-2}$ m.s$^{-1}$, le nombre de Reynolds associé à ce système est de l'ordre de

$$Re = \frac{\rho_f R_p V_{in}}{\mu_f} \sim 10. \tag{4.3}$$

Nous sommes donc dans le cas d'un écoulement laminaire.

**Conditions aux limites** En notant $\overrightarrow{e_1}$ la direction principale de l'écoulement, la vitesse moyenne du fluide en entrée de l'implant $\overrightarrow{V_{in}} = V_{in}\overrightarrow{e_1}$ se déduit du débit imposé par la pompe péristaltique $\overrightarrow{Q}$ d'après

$$\overrightarrow{V_{in}} = \frac{\overrightarrow{Q}}{S_f} \tag{4.4}$$

avec $S_f = \eta_f S$, où $S_f$ est l'aire de la fraction de la face d'entrée de l'échantillon (d'aire $S$) occupée par du fluide, et $\eta_f$ est la porosité du biomatériau. On utilise donc ici l'hypothèse de Delesse [58], qui stipule que pour un milieu poreux faiblement structuré, les porosités surfacique et volumique sont égales. On impose également une condition de non-glissement aux parois, d'où, sur l'ensemble de l'interface fluide/solide,

$$\overrightarrow{v} = \overrightarrow{0} \tag{4.5}$$

Le tenseur des contraintes s'exerçant dans le domaine fluide $\boldsymbol{\sigma}$ s'écrit

$$\boldsymbol{\sigma} = -P\boldsymbol{I} + \boldsymbol{\sigma}_f \quad \text{avec} \quad \boldsymbol{\sigma}_f = 2\mu_f(\nabla\overrightarrow{v} + \nabla\overrightarrow{v}^T), \tag{4.6}$$

$P$ étant la pression, $\boldsymbol{I}$ le tenseur identité, $\boldsymbol{\sigma}_f$ le tenseur des contraintes de cisaillement et $\nabla\overrightarrow{v}^T$ la transposée du gradient $\nabla\overrightarrow{v}$. En notant $\overrightarrow{n_S}$ le vecteur normal sortant du volume de fluide, la

condition en sortie du biomatériau, où le fluide s'écoule sans rencontrer de résistance, revient à

$$P = 0 \quad \text{et} \quad \boldsymbol{\sigma}_f . \overrightarrow{n_S} = \overrightarrow{0}, \tag{4.7}$$

### 4.1.3 Interactions fluide/cellules

Comme mentionné au chapitre 2, les cellules sont particulièrement sensibles au niveau de cisaillement, défini par le vecteur contrainte de cisaillement $\overrightarrow{\tau} = \mu_f \left( \nabla \overrightarrow{v} + \nabla \overrightarrow{v}^T \right) . \overrightarrow{n_S}$, généré à leur surface par l'écoulement du fluide environnant. Leur capacité à adhérer puis à rester attachées à la paroi du biomatériau, en particulier, est directement reliée à ce paramètre.

#### Conséquences sur l'étape d'ensemencement : adhésion des cellules

Lors de l'étape d'ensemencement, les interactions fluide/cellules se traduisent essentiellement par la modulation de la capacité de ces dernières à adhérer aux parois du biomatériau. En effet, la fraction des cellules adhérant à une paroi après être entrées en contact avec celle-ci sous l'action de l'écoulement d'un fluide décroît linéairement au-delà d'une valeur seuil de cisaillement $\tau_1$ [86]. Il existe donc un deuxième seuil, $\tau_2$, au-delà duquel plus aucune cellule ne peut adhérer à la paroi, les efforts générés localement par l'écoulement du fluide étant trop importants. La valeur de ces deux seuils dépend des cellules et du biomatériau utilisés. En nous appuyant sur les données de Rüster et al. [227], nous considérerons ici que, pour des cellules souches mésenchymateuses entrant en contact avec du phosphate tricalcique $\beta$, on a : $\tau_1 = 0$ Pa et $\tau_2 = 0.1$ Pa. On peut alors définir la fonction $attach_cisaill$, qui estime la fraction de cellules adhérant à la paroi lors leur contact avec cette dernière en fonction du cisaillement local $\tau = \| \overrightarrow{\tau} \|$ selon

$$\begin{array}{rccl} attach_cisaill : & \mathbb{R}^+ & \longrightarrow & [0,1] \\ & \tau & \longmapsto & \left\{ \begin{array}{ll} 1 & \text{pour } \tau \leq \tau_1 \\ 1 - 10\tau & \text{pour } \tau_1 < \tau \leq \tau_2 \\ 0 & \text{pour } \tau > \tau_2 \end{array} \right. \end{array} \tag{4.8}$$

où $\mathbb{R}^+$ désigne l'ensemble des nombres réels positifs.

Le deuxième paramètre nécessaire à l'identification des zones d'adhésion cellulaire est l'orientation locale de la paroi par rapport au sens de l'écoulement, afin de déterminer si les cellules sont susceptibles ou non d'entrer en contact avec cette dernière (paroi "atteignable" ou non par les cellules). En considérant que les cellules en suspension dans le fluide peuvent être représentées par des sphères de rayon $R_{cell} = 7.5$ $\mu$m [165], on définit alors pour tout point $M$ situé sur l'interface fluide/solide un point $N$ correspondant, situé à l'intérieur du fluide, tel que $\overrightarrow{MN} = R_{cell}\overrightarrow{n_S(M)}$, où $\overrightarrow{n_S(M)}$ est le vecteur normal unitaire sortant du domaine fluide au point $M$. L'orientation du vecteur vitesse du fluide au point $N$ nous renseigne alors sur la possibilité d'une cellule arrivant au voisinage du point $M$ de rentrer en contact avec la paroi à cet endroit (voir figure 4.3). La fonction $attach_paroi$, qui caractérise cette possibilité, peut alors être définie selon [1]

$$
\begin{aligned}
attach_paroi : \quad \mathbb{R}^3 \times \mathbb{R}^3 &\longrightarrow [0,1] \\
\left(\overrightarrow{n_S}; \overrightarrow{v(N)}\right) &\longmapsto \begin{cases} 0 & \text{si } \overrightarrow{n_S}.\overrightarrow{v(N)} \leq 0 \\ 1 & \text{si } \overrightarrow{n_S}.\overrightarrow{v(N)} > 0 \end{cases}
\end{aligned}
\tag{4.9}
$$

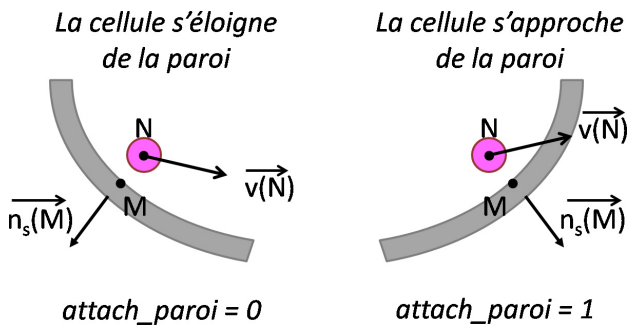



FIGURE 4.3 – Détermination de la capacité d'une zone de la paroi à être atteinte par les cellules

Pour qu'une cellule puisse adhérer à la paroi du biomatériau, il faut que celle-ci remplisse localement les critères d'atteignabilité et de cisaillement. Ceux-ci étant indépendants, la probabilité

1. Notons qu'il s'agit ici d'un choix simple nous permettant de considérer les probabilités $attah_paroi$ et $attach_cisaill$ comme indépendantes, qui devra être affiné lors d'études ultérieures. On pourra pour cela caractériser le mode préférentiel d'impact des cellules sur la paroi (inertiel, diffusionnel ou sédimentaire) en évaluant le nombre de Stokes particulaire du système $St \equiv \frac{V_{in} R_{cell}^2 d_{cell}}{\mu_f R_p}$, avec $d_{cell}$ la masse volumique des cellules et $R_p$ et $R_{cell}$ les rayons respectifs d'un pore et d'une cellule. Pour des cellules isolées, on obtient alors $St \sim 10^{-3}$. Pour des agrégats de cellules en revanche (ce qui semble correspondre aux observations expérimentales) $St \sim 10^{-1}$.

d'adhésion d'une cellule en un point $M$ quelconque de l'interface fluide/solide est caractérisée par la fonction $attach$, définie par

$$\begin{array}{rccl} attach: & \mathbb{R}^+ \times \mathbb{R}^3 \times \mathbb{R}^3 & \longrightarrow & [0,1] \\ & \left(\tau; \overrightarrow{n_S}; \overrightarrow{v(N)}\right) & \longmapsto & attach_cisaill(\tau) \times attach_paroi\left(\overrightarrow{n_S}; \overrightarrow{v(N)}\right) \end{array} \tag{4.10}$$

**Conséquences sur l'étape de prolifération : perte d'adhésion cellulaire**

Dans le cadre de ce modèle, la phase de culture de l'organoïde est réduite à la phase de croissance cellulaire exponentielle (voir figure 4.1). Au cours de celle-ci, l'écoulement du fluide intervient de deux façons différentes, *via* le cisaillement qu'il engendre à la surface des cellules sur l'activité cellulaire locale : il peut détacher les cellules de la paroi d'une part, et influencer leur vitesse de prolifération d'autre part. Ce dernier point sera traité au paragraphe 4.1.5.

De manière similaire au mécanisme d'adhésion cellulaire (lors de l'ensemencement), il existe une valeur seuil de cisaillement $\tau_3$ à partir de laquelle les cellules commencent à se détacher linéairement de la paroi sous l'action du fluide. La fraction de cellules adhérentes décroît donc jusqu'à atteindre un deuxième seuil $\tau_4$, au-delà duquel toutes les cellules sont détachées de la paroi [59, 81]. Ainsi, connaissant la valeur du premier seuil $\tau_3 = 1.5$ Pa [59] et le seuil de cisaillement critique $\tau_c = 10.2$ Pa, pour lequel $50\%$ des cellules mésenchymateuses sont détachées d'un support en $\beta$TCP [140, 218], on peut définir $\tau_4 = 18.9$ Pa et une fonction $detach_cisaill$ qui, de manière analogue à la fonction $attach_cisaill$, relie le cisaillement local $\tau$ (en Pa) à la fraction de cellules adhérant à la paroi :

$$\begin{array}{rccl} detach_cisaill: & \Re & \longrightarrow & [0,1] \\ & \tau & \longmapsto & \begin{cases} 1 & \text{pour } \tau \leq \tau_3 \\ 1.086 - 0.0575\tau & \text{pour } \tau_3 < \tau \leq \tau_4 \\ 0 & \text{pour } \tau > \tau_4 \end{cases} \end{array} \tag{4.11}$$

### 4.1.4 Transport des espèces chimiques

Dans le cadre de ce modèle, on se limite à l'étude de deux espèces chimiques : l'oxygène et le glucose. Nous avons vu au chapitre 1 que le maintien d'un taux suffisant d'oxygène au cœur des implants constitue en effet un problème clé dans la mise en culture d'organoïdes de grande taille. Le glucose, molécule de taille plus imposante et diffusant moins rapidement au sein du fluide de culture, est quant à lui choisi comme modèle pour les nutriments, afin d'avoir un aperçu de leur pénétration et de leur évolution au sein du biomatériau.

**Equation de transport** En régime stationnaire, le transport de ces deux espèces chimiques satisfait l'équation de convection-diffusion suivante :

$$\nabla.(-D_i \nabla C_i + \overrightarrow{v} C_i) = 0, \qquad i = ox \text{ ou } glu \tag{4.12}$$

où $D_i$ est le coefficient de diffusion isotrope de l'espèce chimique concernée et $C_i$ sa concentration.

**Conditions aux limites** En entrée du biomatériau, on impose les concentrations en oxygène et en glucose $C_{ox,0}$ et $C_{glu,0}$. On suppose de plus que la concentration ionique du fluide reste constante après sa sortie du biomatériau. Ainsi, sur la face avale de l'échantillon, on impose la relation suivante

$$\nabla C_i.\overrightarrow{n_S} = 0 \tag{4.13}$$

Enfin, au niveau de l'interface fluide/solide, un flux sortant $Q_i$ matérialise la consommation cellulaire. Cette dernière, supposée indépendante du taux de cisaillement, est supposée suivre la loi de Michaelis-Menten [190], d'où

$$Q_i = -D_i \nabla C_i.\overrightarrow{n_S} = \sigma_{cell} R_{i,max} \frac{C_i}{k_i + C_i} \tag{4.14}$$

où $\sigma_{cell}$ est la densité surfacique de cellules au niveau de la paroi du pore considéré, $R_{i,max}$ (en mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$) est le taux de consommation maximal cellulaire de l'espèce chimique étudiée (*i.e.* quand celle-ci se trouve en excès) et $k_i$ est la constante de Michaelis-Menten associée à l'espèce chimique et au type cellulaire considérés. On suppose de plus que les mécanismes de consomma-

tion cellulaire de glucose et d'oxygène sont indépendants, ce qui, d'après les travaux de Dos Santos et al. [63], peut se justifier dans les plages de concentrations étudiées.

Les valeurs des différents paramètres utilisés dans les équations précédentes sont regroupées dans le tableau 4.1.

| Paramètres | Notation | Valeurs | Source |
|---|---|---|---|
| Concentration du fluide de culture en oxygène | $C_{ox,0}$ | $0.21 \times 10^3$ mol.m$^{-3}$ | fluide saturé en oxygène |
| Concentration du fluide de culture en oxygène | $C_{glu,0}$ | $5.55$ mol.m$^{-3}$ | composition du milieu de culture utilisé * |
| Coefficient de diffusion de l'oxygène | $D_{ox}$ | $2 \times 10^{-9}$ m$^2$.s$^{-1}$ | Inamdar et al. [116], Krinner et al. [139], Weber et al. [264] |
| Coefficient de diffusion du glucose | $D_{glu}$ | $5 \times 10^{-10}$ m$^2$.s$^{-1}$ | Weber et al. [264] |
| Taux de consommation cellulaire maximal d'oxygène | $R_{ox,max}$ | $7.5 \times 10^{-17}$ mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$ | Krinner et al. [139], Zhao et al. [285] |
| Taux de consommation cellulaire maximal de glucose | $R_{glu,max}$ | $9.25 \times 10^{-15}$ mol.cell$^{-1}$.s$^{-1}$ | Kasper et al. [123] |
| Constante de Michaelis-Menten pour le couple (CSM,oxygène) | $k_{ox}$ | $0.1$ mol.m$^{-3}$ | Inamdar et al. [116] |
| Constante de Michaelis-Menten pour le couple (CSM,glucose) | $k_{glu}$ | $7.21 \times 10^{-1}$ mol.m$^{-3}$ | Kasper et al. [123] |

TABLE 4.1 – Paramètres utilisés pour le modèle de transport et de consommation cellulaire de l'oxygèe et du glucose.
* MEM$\alpha$ (Gibco®, Life Technologies) utilisé lors des tests expérimentaux (voir chapitre 3).

### 4.1.5 Prolifération cellulaire

Durant la phase de croissance cellulaire exponentielle, l'activité cellulaire est dédiée à la prolifération, aux dépends par exemple de la production de matrice extracellulaire ou de la différenciation. La vitesse de prolifération est propre à chaque type cellulaire, mais le taux de prolifération observé expérimentalement est également influencé par les conditions environnementales de culture. Ainsi, les trois paramètres environnementaux étudiés ici – le cisaillement et les concentrations en

oxygène et en glucose – interviennent dans la régulation locale de la vitesse de prolifération. La croissance cellulaire peut ainsi être caractérisée par l'équation

$$\frac{\partial \sigma_{cell}}{\partial t} = \sigma_{cell} \times prolif\,(\tau; C_{ox}; C_{glu}) \tag{4.15}$$

où $prolif\,(\tau; C_{ox}; C_{glu})$ est le taux de prolifération cellulaire effectif, prenant en compte l'influence des paramètres environnementaux. On supposera de plus ici, de même que pour les phénomènes de consommation, que ces influences sont indépendantes les unes des autres. On peut alors écrire

$$\begin{aligned} prolif: \quad \mathbb{R}^+ \times \mathbb{R}^+ \times \mathbb{R}^+ &\longrightarrow \mathbb{R} \\ (\tau; C_{ox}; C_{glu}) &\longmapsto \alpha_{cell} \times prolif_cisaill(\tau) \times prolif_ox(C_{ox}) \times prolif_glu(C_{glu}) \end{aligned} \tag{4.16}$$

où le taux de prolifération de référence des cellules souches mésenchymateuses vaut $\alpha_{cell} = 0.5$ cell.jour$^{-1}$, ce qui correspond au temps moyen de doublement de 2 jours observé lors de la mise en culture de ce type de cellules en boîtes de Petri sous atmosphère libre (*i.e.* pour lesquelles $C_{ox} = 0.21$ mol.m$^{-3}$). Il reste donc à définir les fonctions $prolif_cisaill$, $prolif_ox$ et $prolif_glu$, relatives aux influences des facteurs environnementaux sur l'activité de prolifération cellulaire.

**Influence du cisaillement** En fonction de sa valeur, le cisaillement engendré par l'écoulement au niveau de la paroi cellulaire favorise différents types d'activités cellulaires (prolifération, différenciation, production de MEC). En interpolant les données expérimentales recueillies par Park et al. [210], on peut alors caractériser l'influence du cisaillement sur la prolifération avec la fonction suivante :

$$\begin{aligned} prolif_cisaill: \quad \mathbb{R}^+ &\longrightarrow \mathbb{R} \\ \tau &\longmapsto 4.41 \exp(34.72\tau) - 3.41 \exp(165.6\tau) \end{aligned} \tag{4.17}$$

où exp définit la fonction exponentielle. Les données expérimentales utilisées pour cette interpolation et l'intervalle de confiance correspondant sont représentés sur la figure 4.4.

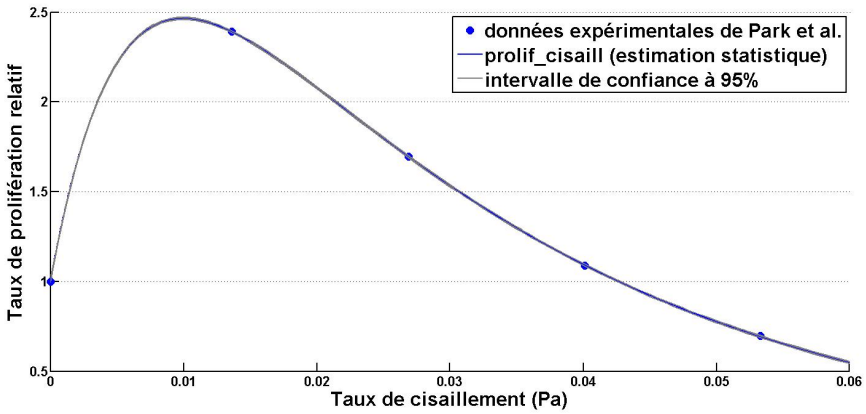



FIGURE 4.4 – Fonction $prolif_cisaill$ estimée à partir des données expérimentales de Park et al. [210].

**Influence du glucose** Dans le cadre de ce travail, nous supposerons que l'impact de la concentration locale en glucose sur la prolifération cellulaire suit la loi de Monod [158], ce qui revient à supposer qu'il n'existe pas de concentration de glucose optimale pour la prolifération des cellules souches mésenchymateuses : il suffit de maintenir ce dernier en excès pour que la croissance cellulaire se déroule dans des conditions favorables. On peut alors définir la fonction $prolif_glu$ selon

$$\begin{aligned} prolif_glu : \quad \mathbb{R}^+ &\longrightarrow \mathbb{R} \\ C_{glu} &\longmapsto \frac{C_{glu}}{K_{M,glu} + C_{glu}} \end{aligned} \tag{4.18}$$

avec $K_{M,glu} = 83.25 \times 10^{-2}$ mol.m$^{-3}$ [264] la constante de Monod associée au couple (CSM, glucose). La loi ainsi obtenue est représentée sur la figure 4.5.

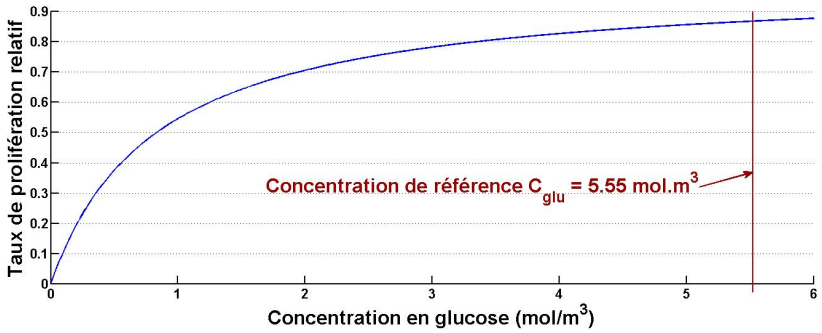



FIGURE 4.5 – Fonction $prolif_glu$ estimée à partir de la loi de Monod.

**Influence de l'oxygène** Contrairement au glucose, des études expérimentales ont montré qu'il existe une concentration en oxygène optimale pour la prolifération des CSMs, inférieure à celle des milieux de culture classiques laissés à l'air libre (*i.e.* tels que $C_{ox} = 0.21$ mol.m$^{-3}$). La loi de Monod ne semble donc pas adaptée dans ce cas. C'est pourquoi nous avons défini la fonction $prolif_ox$ en interpolant les données expérimentales obtenues par Fehrer et al. [71], pour prendre en compte l'existence de cet optimum. On obtient alors la loi suivante

$$\begin{array}{rccc} prolif_ox: & \mathbb{R}^+ & \longrightarrow & \mathbb{R} \\ & C_{ox} & \longmapsto & \dfrac{f_{ox}\left(C_{ox}\right)}{f_{ox}\left(0.21\right)} \end{array} \tag{4.19}$$

avec

$$\begin{array}{rccc} f_{ox}: & \mathbb{R}^+ & \longrightarrow & \mathbb{R} \\ & C_{ox} & \longmapsto & \dfrac{19.83 C_{ox}}{4.135 \times 10^{-3} + C_{ox}} \times \exp(-21.39 {C_{ox}}^2) \end{array} \tag{4.20}$$

qui correspond au produit d'une gaussienne avec une fonction de la même forme mathématique que la loi de Monod. Les données expérimentales utilisées pour cette interpolation et l'intervalle de confiance correspondant sont représentés sur la figure 4.6.

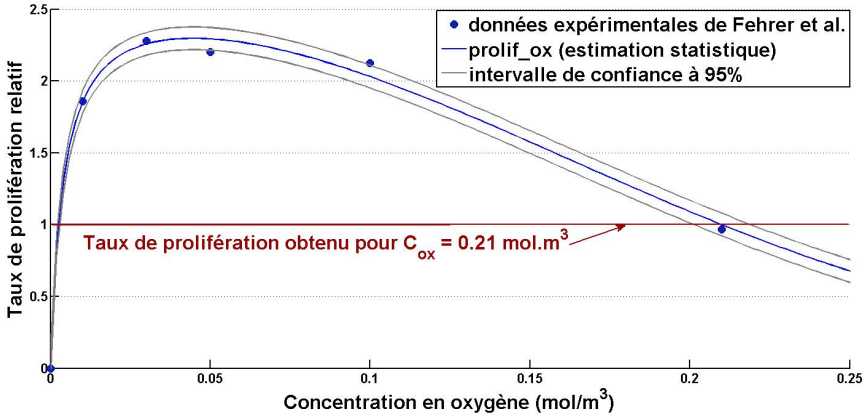



FIGURE 4.6 – Fonction $prolif_ox$ estimée à partir des données expérimentales de Fehrer et al. [71].

### 4.1.6 Bilan

L'ensemble des équations constituant le modèle présenté dans ce paragraphe est regroupé dans le tableau 4.2.

| Phénomène physique | Loi utilisée | Processus biomécaniques correspondants |
|---|---|---|
| Ecoulement du fluide | Equation de Stokes (équation (4.1)) | Adhésion cellulaire (équations (4.10) et (4.11)) |
| Transport des espèces chimiques | Equation de convection/diffusion (équation (4.12)) | Consommation cellulaire (équation (4.14)) |
| Prolifération cellulaire | Equation (4.15) | Influence des paramètres environnementaux (équations (4.17), (4.18) et (4.19)) |

TABLE 4.2 – Equations constituant le modèle présenté dans ce chapitre.

Les équations correspondant à l'écoulement du fluide et au transport des espèces chimiques sont résolues à l'aide de la méthode des éléments finis, en utilisant le logiciel COMSOL Multiphysics® (version $4.2$a). Les équations relatives au comportement cellulaire sont ensuite traitées en parallèle après chaque simulation (voir paragraphes 4.2.2 et 4.2.3).

## 4.2 Résolution numérique

### 4.2.1 Géométrie modélisée

A partir de la description théorique des biomatériaux utilisés pour les essais expérimentaux présentés au chapitre 3, il est possible de construire une structure alvéolaire idéalisée, formée de quelques pores sphériques de $800$ $\mu$m de diamètre, disposés périodiquement et reliés par des connexions de $100$ $\mu$m de diamètre (voir figure 4.7). Les différents paramètres évalués au cours de l'étude (*via* les fonctions $attach$ et $prolif$) sont alors moyennés au niveau de chaque pore. On s'intéresse ici à l'évolution des paramètres physico-chimiques au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la partie amont de l'implant. C'est pourquoi une seule couche de pores est représentée dans la direction $\vec{e_3}$. De même, dans la direction $\vec{e_2}$, nous avons modélisé deux colonnes de pores, pour observer l'évolution locale de l'écoulement au niveau des connexions. Dans la direction $\vec{e_1}$ en revanche, six pores sont modélisés, ce qui correspond à une épaisseur de $4.02$ mm, soit environ $40\%$ de la longueur totale de l'échantillon.

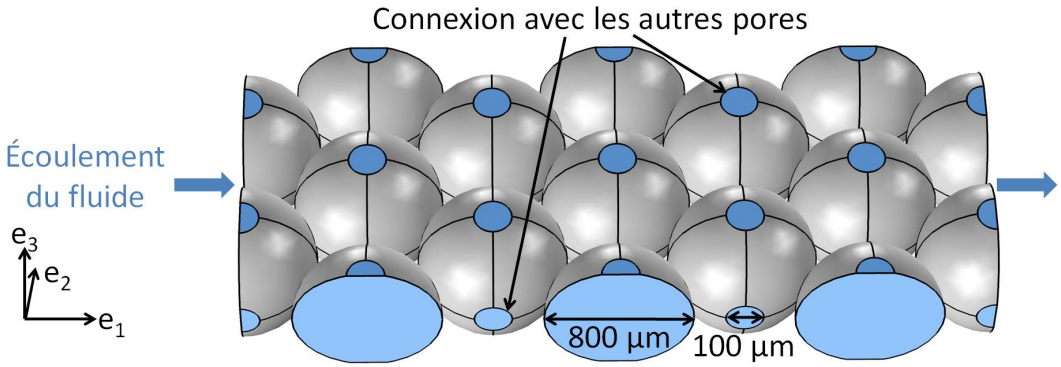



FIGURE 4.7 – Vue en perspective de la géométrie idéalisée modélisée

Dans cette étude, seul le volume fluide est modélisé, le biomatériau étant supposé rigide et inerte d'un point de vue chimique. De même, les cellules ne sont pas directement représentées : leur présence est prise en compte *via* la modification géométrique du domaine de fluide qu'elles engendrent, et par leur consommation de nutriments. La première est déterminée en calculant, pour chaque pore, le volume cellulaire présent à l'instant considéré, puis en supposant que ce volume forme une couche continue le long des parois concernées de telle sorte que, le pore, initialement sphérique, devienne localement ellipsoïdal (voir figure 4.8). La deuxième est alors modélisée par un flux d'oxygène et de glucose sortant au niveau des parois comportant des cellules (en rose sur la figure 4.8), suivant les lois définies au paragraphe 4.1.

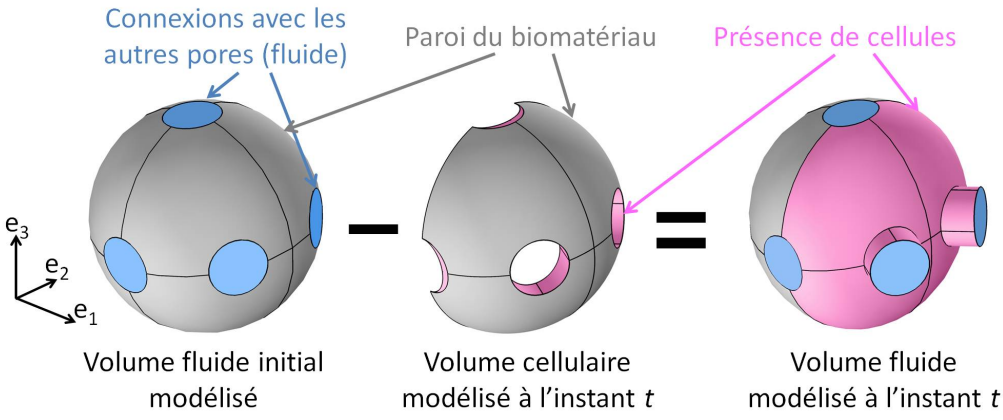



FIGURE 4.8 – Domaine du fluide et couche cellulaire

Ainsi, les phénomènes d'échanges et d'écoulement ayant éventuellement lieu à l'intérieur de la couche cellulaire ne sont pas étudiés dans ce modèle : on s'intéresse ici à l'évolution des conditions

physico-chimiques au voisinage de cette dernière, pour évaluer l'impact des conditions de culture et de la géométrie du biomatériau sur la possibilité maintenir des conditions satisfaisantes au sein du volume de l'échantillon.

Pour éviter la présence de faces très fines, qui peuvent nuire à la qualité des résultats obtenus par la méthode des éléments finis (singularités géométriques), la géométrie des pores modélisés n'est modifiée que si la différence entre le rayon du pore initial et le demi-axe dans la direction $\vec{e_1}$ de l'ellipsoïde correspondant atteint $20$ $\mu$m. De même, les connexions entre pores sont supposées garder un diamètre constant au cours des étapes d'ensemencement et de culture simulées. Cette première approche néglige donc leur obstruction progressive, ce qui en fait un cas d'étude optimiste pour le transport des cellules et des espèces chimiques au sein de l'échantillon.

Remarque : Comme nous le verrons aux paragraphes 4.3 et 4.4, le taux d'attachement cellulaire (traduit par la fonction $attach_cisaill$) et de prolifération cellulaire (traduit par la fonction $prolif$) sont très faibles dans ces zones de connexion, où la valeur du cisaillement est plus importante. Il s'agit donc de zones à faible présence cellulaire, ce qui nous conforte dans le choix de négliger en première approche l'évolution temporelle de leur diamètre.

Par ailleurs, pour plus de clarté dans la suite de la rédaction de ce chapitre, les différentes rangées de pores sont numérotées en fonction de leur position au sein de l'échantillon, tel que présenté sur la figure 4.9.

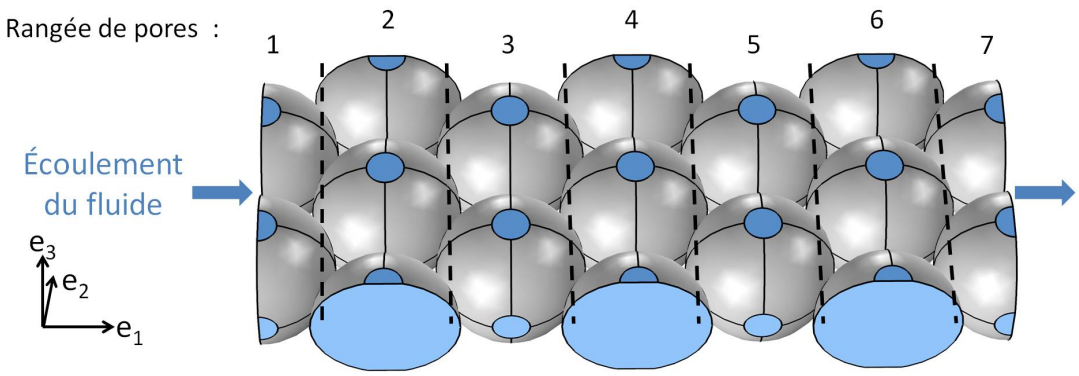



FIGURE 4.9 – Numérotation des rangées de pores dans le sens de la progression du fluide

**Maillage et méthode de résolution**

Chacune des géométries modélisées a été maillée avec environ $4\times10^6$ éléments. Le domaine du fluide est ainsi découpé en éléments tétraédriques, à l'exception d'une couche de $14$ $\mu$m d'épaisseur environ située le long des interfaces fluide/solide, dans laquelle un maillage en couches limites est réalisé à l'aide d'éléments hexaédriques, pyramidaux, prismatiques, et parallélépipédiques. L'ensemble de ces éléments est associé à des fonctions d'interpolations linéaires.

La résolution des équations présentées au paragraphe 4.1 se fait alors en régime stationnaire à l'aide d'une méthode de Newton avec coefficient d'amortissement, en utilisant le logiciel COMSOL Multiphysics® (version $4.2$a). Le système étudié comporte environ $4 \times 10^6$ degrés de liberté lors de la simulation de l'écoulement et $2 \times 10^6$ degrés de liberté lors de la simulation du transport des espèces chimiques. Les temps de calculs sont de l'ordre de l'heure.

### 4.2.2 Simulation de l'ensemencement cellulaire

Lors de l'ensemencement cellulaire, seuls les effets hydrodynamiques interviennent dans la détermination des zones d'adhésion cellulaire. Comme présenté au paragraphe 4.1.2, on impose la vitesse moyenne d'écoulement en entrée du biomatériau (voir équation (4.4)), et le fluide s'écoule sans résistance en sortie de ce dernier (voir équation (4.7)). Ces conditions aux limites sont ensuite complétées par une condition de non-glissement aux parois fluide/biomatériau et fluide/cellules (voir équation (4.5)), et une condition de symétrie le long des faces issues de la découpe du biomatériau liée à sa périodicité (voir figure 4.10), soit

$$\overrightarrow{v}.\overrightarrow{n_S} = 0 \quad \text{et} \quad [\![\boldsymbol{\sigma}.\overrightarrow{n_S}]\!] = \overrightarrow{0}, \tag{4.21}$$

la deuxième équation traduisant la continuité des contraintes normales.

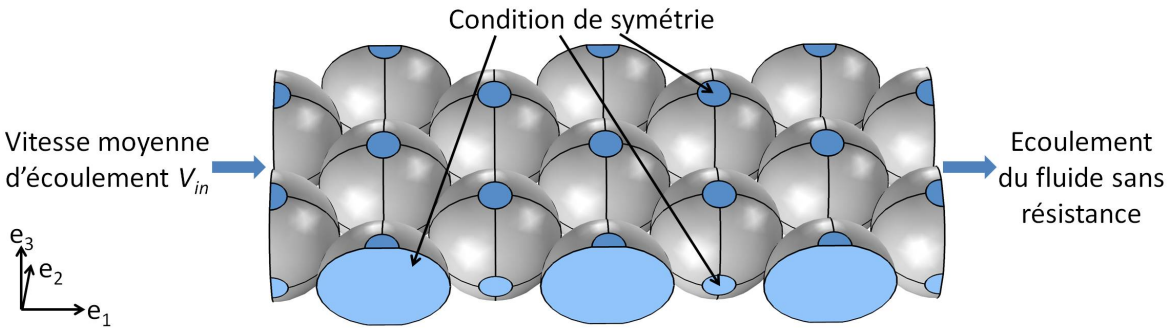



FIGURE 4.10 – Conditions aux limites imposées lors de la simulation de l'ensemencement cellulaire

### Algorithme

Dans la majorité des essais présentés au chapitre 3, un million de cellules ont été injectées dans un délai de 30 secondes. En nous appuyant sur ces données, nous avons défini différents paramètres d'entrée du modèle pour l'étape d'ensemencement. Tout d'abord, l'intervalle de temps $\Delta t$ séparant deux simulations correspond à la durée nécessaire à la traversée d'un pore dans le cas du débit le plus faible (soit avec une vitesse moyenne d'écoulement de $0.5$ m.s$^{-1}$), soit $\Delta t = 2$s. Le nombre de cellules $\Delta cell$ entrant dans l'échantillon à chaque intervalle de temps est ensuite déterminé selon

$$\Delta cell = cell_{tot} \times \frac{\Delta t}{T_{inj}} \times \frac{S_{f,loc}}{S_f} \tag{4.22}$$

où $cell_{tot} = 10^6$ cellules désigne le nombre total de cellules injectées dans l'échantillon, $T_{inj} = 30$ s le temps total d'injection, $S_{f,loc} = 2 \times \pi \times 400^2 \mu$m$^2$ l'aire de la section droite du système modélisé occupée par le fluide (soit deux pores) et $S_f$ l'aire de la fraction de la section droite de l'échantillon complet occupée par le fluide. En se plaçant dans le cadre de l'hypothèse de Delesse [58], on a de plus

$$\eta_f = \frac{V_f}{V} \equiv \frac{S_f}{S} \tag{4.23}$$

avec $\eta_f$ la porosité du biomatériau, $V_f$ le volume occupé par le fluide, $V$ le volume de l'échantillon et $S$ sa section droite, d'où $S_f \equiv \eta_f S$. Enfin, en combinant les équations (4.22) et (4.23), on obtient $\Delta cell = 1884$ cellules, soit $942$ cellules par pore.

Les différents paramètres utilisés pour ce modèle sont regroupés dans le tableau 4.3.

| Paramètres | Notation | Valeurs |
|---|---|---|
| Vitesse moyenne d'écoulement en entrée de l'échantillon | $V_{in}$ | $\{0.5; 5; 7.5, 8.5; 9.5, 10\}$ m.s$^{-1}$ |
| Pas de temps | $\Delta t$ | 2 s |
| Nombre de cellules entrant dans l'échantillon à chaque pas de temps | $\Delta cell$ | 942 cellules/(pore$\times\Delta t$) |

TABLE 4.3 – Paramètres d'entrée du modèle d'ensemencement cellulaire d'un biomatériau

A chaque intervalle de temps, il est alors possible de déterminer le nombre de cellules ensemencées dans les différents pores de l'échantillon, selon l'algorithme présenté sur la figure 4.11.

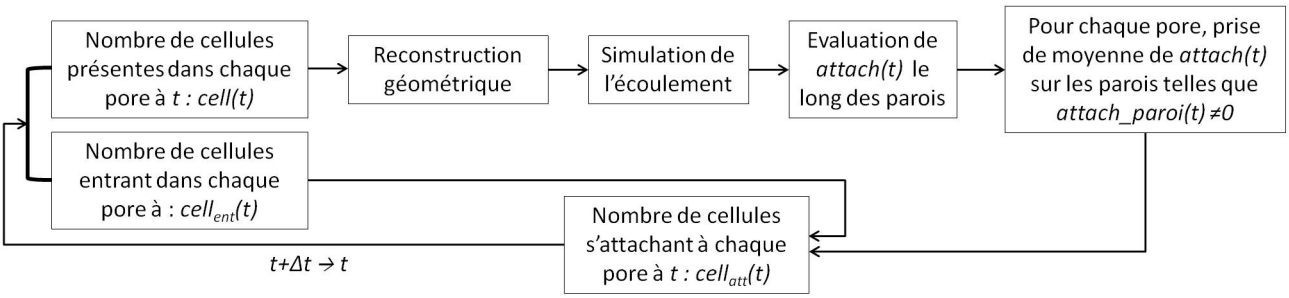



FIGURE 4.11 – Algorithme utilisé pour la simulation de l'ensemencement cellulaire

Pour cela, connaissant le nombre de cellules $cell(t)$ déjà greffées dans chaque pore à l'instant considéré, on détermine tout d'abord la configuration géométrique de l'échantillon, *i.e.* le domaine de fluide disponible dans chaque pore après soustraction du volume de la couche cellulaire (voir paragraphe 4.2.1). L'écoulement du fluide est ensuite simulé dans le système ainsi obtenu, puis la fonction $attach$ est évaluée le long de ses parois. Celle-ci permet d'une part de déterminer dans chaque pore les régions de l'interface fluide/biomatériau atteignables par les cellules ($attach_paroi \neq 0$), et d'autre part d'estimer le taux moyen d'adhésion cellulaire $\overline{attach(t)}$ dans ces régions (*via* la fonction $attach_cisaill$). Il est alors possible, en progressant de la face amont du domaine vers sa face aval, de déterminer, de pore en pore, le nombre de cellules qui s'attachent aux parois à l'instant $t$, selon

$$cell_{att}(t) = cell_{ent}(t) \times \overline{attach(t)} \times \left(1 - \frac{S_{conn}}{S_{conn} + S_{att}}\right) \tag{4.24}$$

où $cell_{ent}(t)$ désigne le nombre de cellules entrant dans le pore à l'instant considéré, $S_{conn}$ l'aire de la section droite des connexions avec les pores situés en aval (voir figure 4.12) et $S_{att}$ l'aire de l'interface fluide/biomatériau disponible à la colonisation cellulaire (*i.e.* les parois pour lesquelles $attach_paroi(t) \neq 0$). Pour les pores situés au niveau de la face amont de l'échantillon, on a donc $cell_{ent}(t) = \Delta cell$. Pour les autres, $cell_{ent}(t)$ représente le nombre de cellules ayant traversé les pores situés en amont du pore étudié et y pénétrant à l'instant $t$. Le ratio $cell_{trav}(t) = cell_{ent}(t) \times S_{conn}/\left(S_{conn} + S_{att}\right)$ correspond quant à lui à la fraction des cellules entrées dans le pore étudié à l'instant $t$ qui traverse ce dernier sans entrer en contact avec la paroi, étant ainsi directement transmises aux pores situés en aval.

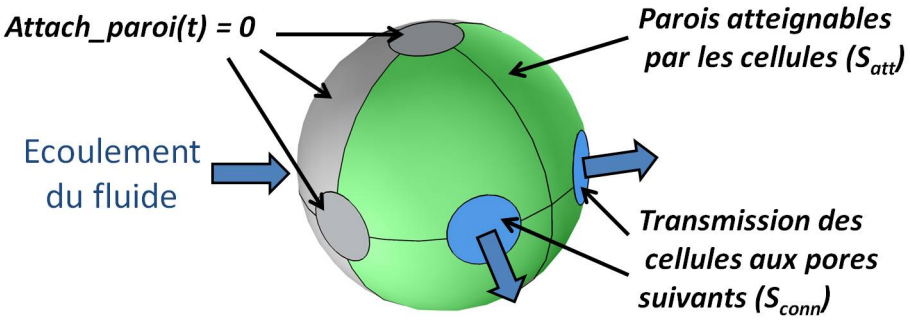



FIGURE 4.12 – Régions d'un pore susceptibles d'être colonisées par les cellules

Enfin, on détermine pour chaque pore le nombre de cellules transmises aux pores situés en aval à l'instant $t$, qui servira à déterminer le nombre de cellules entrant dans chaque pore au pas de temps $t + \Delta t$, selon

$$cell_{trans}(t) = cell_{ent}(t) - cell_{att}(t) \tag{4.25}$$

De même, le nombre total de cellules greffées dans chaque pore à l'intervalle de temps suivant vaut

$$cell(t + \Delta t) = cell(t) + cell_{att}(t) \tag{4.26}$$

avec $cell(t = 0) = 0$ pour l'ensemble des pores.

### 4.2.3 Simulation de la prolifération cellulaire

On suppose cette fois que l'ensemencement cellulaire a été réalisé, et que le processus d'adhésion des cellules est terminé. On s'intéresse alors à la phase de prolifération cellulaire au sein de l'échantillon. Pour assurer des apports constants en oxygène et en glucose, on impose en entrée de ce dernier un écoulement continu, de vitesse moyenne $0.57$ m.s$^{-1}$ (correspondant à un débit de $1$ ml.min$^{-1}$). De même que lors de la simulation de l'ensemencement cellulaire, le fluide s'écoule sans résistance en aval du biomatériau, et des conditions de symétrie sont imposées au niveau des découpes réalisées en raison de la périodicité de la géométrie (voir figure 4.13). De plus, la consommation cellulaire en oxygène et en glucose est représentée par un flux sortant, respectant les lois définies au paragraphe 4.1, au niveau des parois contenant des cellules (en rose sur la figure 4.13).

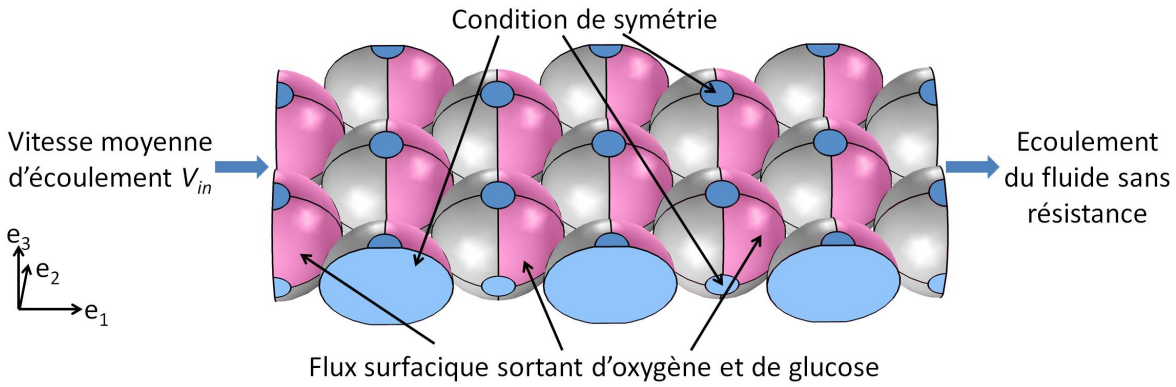



FIGURE 4.13 – Conditions aux limites appliquées lors de la simulation de la prolifération cellulaire au sein des échantillons

Pour comparer l'influence de la répartition cellulaire issue de l'étape d'ensemencement sur le développement de l'implant, nous avons considéré deux répartitions initiales de cellules : une répartition *régulière* – pour laquelle chaque pore contient le même nombre de cellules, réparties sur leurs surfaces atteignables (en rose sur la figure 4.13) – et la répartition obtenue d'après la simulation de l'ensemencement cellulaire réalisé avec une vitesse moyenne de $5$ mm.s$^{-1}$. L'intervalle de temps séparant deux simulations correspond au temps moyen de doublement des cellules souches mésenchymateuses, soit $\Delta t = 2$ jours.

Bien que les mécanismes qui régulent la production de matrice extracellulaire (MEC) après

la phase de prolifération ne soient pas modélisés dans cette étude, nous avons pris en compte le remplissage progressif des pores qui en résulte. Ainsi, en nous appuyant sur les travaux de Nava et al. [196], nous considérerons en première approche que la prolifération s'arrête lorsque la densité surfacique de cellules $\sigma_{conf} = 5.68 \times 10^{9}$ cellules.m$^{-2}$, qui correspond au seuil de confluence cellulaire, est atteinte dans un pore. La production de MEC démarre alors au taux constant de $\partial\, V_{MEC} \,/\, \partial\, t = 2.625 \times 10^{-12}$ m$^3$.jour$^{-1}$. En effet, l'étude numérique de Nava et al. [196], portant sur des implants d'ingénierie tissulaire cartilagineuse dans des conditions physico-chimiques similaires à celles de notre étude, montre une augmentation linéaire du volume de MEC $V_{MEC}$ en fonction du temps. La simulation de l'évolution de l'échantillon modélisé pendant la phase de début de culture est donc réalisée en suivant, à intervalle pas de temps, l'algorithme présenté sur la figure 4.14.

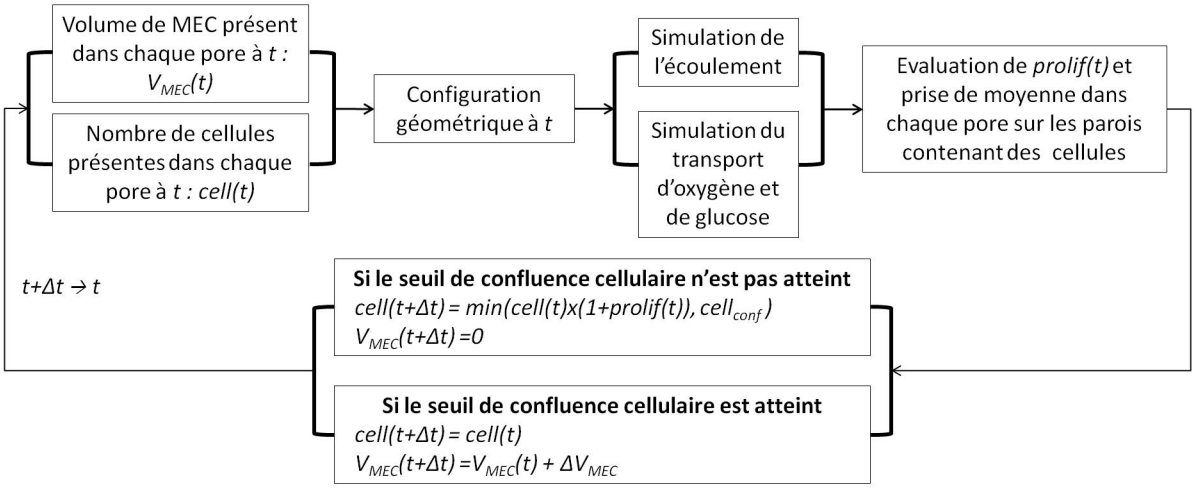



FIGURE 4.14 – Algorithme utilisé pour la simulation de la phase de prolifération cellulaire

Connaissant le nombre de cellules $cell(t)$ et le volume $V_{MEC}$ de matrice extracellulaire dans chaque pore à l'instant $t$, il est en effet possible de déterminer la configuration géométrique correspondante, c'est-à-dire le volume de fluide de l'échantillon étudié une fois les couches de cellules et de MEC retirées de la forme initiale des pores. Au début de la phase de prolifération ($t = 0$), le nombre de cellules présent dans chaque pore dépend de la distribution initiale choisie (distribution régulière ou issue de l'ensemencement réalisé avec une vitesse moyenne de $5$ mm.s$^{-1}$). On simule ensuite l'écoulement du fluide et les phénomènes de transport et de consommation des différentes espèces chimiques à l'aide de la méthode des éléments finis, avant d'évaluer la fonction

$prolif$, définie au paragraphe 4.1, le long des interfaces fluide/cellules et fluide/MEC. Une prise de moyenne de cette fonction est alors effectuée pour chaque pore sur les surfaces concernées, avant de déterminer le nombre de cellules et le volume éventuel de MEC présents à l'instant $t + \Delta t$. Cette détermination se fait de la manière suivante : pour les pores ayant déjà atteint le seuil de confluence à l'instant $t$, le nombre de cellules reste inchangé et le volume de MEC est incrémenté de $\Delta V_{MEC} = \Delta t \times \partial V_{MEC}/\partial t \sim 5.25 \times 10^{-12}$ m$^3$. Pour les pores n'ayant pas atteint ce stade à l'instant $t$, le nombre de cellules présentes à l'instant $t + \Delta t$ est calculé en fonction du taux de prolifération moyen estimé dans le pore considéré, sans dépasser le seuil de confluence cellulaire (voir figure 4.14).

## 4.3 Résultats pour l'étape d'ensemencement cellulaire

Comme indiqué au paragraphe 4.2.2, nous avons simulé l'étape d'ensemencement cellulaire du biomatériau idéalisé en faisant varier la vitesse moyenne du fluide au niveau de la face amont de l'échantillon. Nous avons pour cela choisi une vitesse de $0.5$ mm.s$^{-1}$, qui correspond à un débit d'environ $0.86$ ml.min$^{-1}$ pour les échantillons utilisés lors des essais expérimentaux, et se situe donc au milieu de la plage de débits testés sur ces derniers (voir chapitre 3). Les résultats de cette simulation sont présentés sur la figure 4.15.

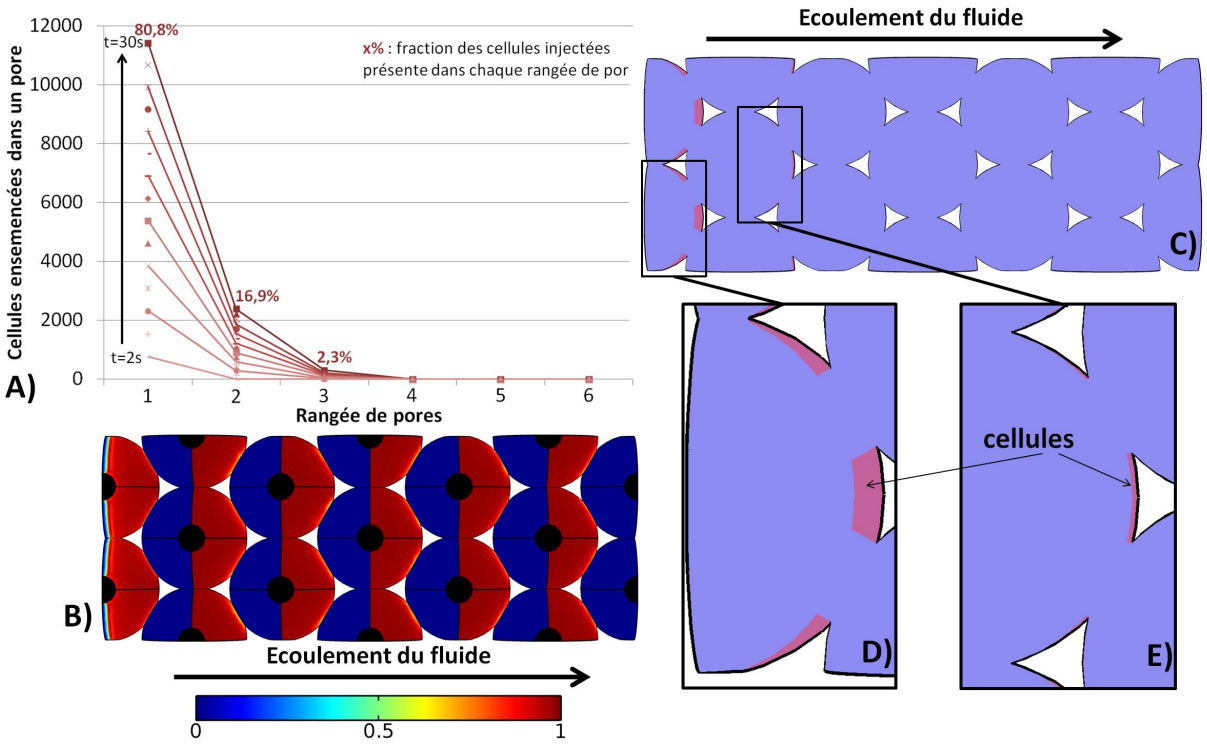



FIGURE 4.15 – Répartition cellulaire au sein de l'échantillon après simulation de la phase d'ensemencement pour une vitesse moyenne d'entrée du fluide de $0.5$ mm.s$^{-1}$. A) : Nombre de cellules ensemencées dans chaque rangée de pores au cours du temps (intervalle de temps entre deux simulations : 2s) ; B) : Valeur de la fonction $attach$ le long des parois à $t = 0$ ; C) : Répartition cellulaire après ensemencement (coupe réalisée au milieu du biomatériau) ; D) et E) : Agrandissements des pores des rangées 1 et 2, pour lesquels une couche cellulaire est observée à la fin de l'ensemencement.

Sur la figure 4.15.A, qui représente le nombre de cellules ensemencées dans chaque pore à chaque pas de temps pour les différentes rangées de pores, on peut observer qu'environ $81\%$ des cellules entrant dans le biomatériau restent dans la première rangée de pores, et $17\%$ d'entre elles adhèrent au biomatériau au niveau de la deuxième rangée de pores, les $2\%$ restants étant transmis à la troisième rangée. Ces observations correspondent aux résultats obtenus expérimentalement : les coupes histologiques des échantillons ensemencés ont montré la formation d'une couche épaisse de cellules sur la face amont des biomatériaux et une deuxième, plus mince, dans les pores situés directement après cette face, seules quelques cellules étant parsemées dans le reste de l'échantillon.

La figure 4.15.B, représentant la fonction $attach$ le long des parois de l'échantillon modélisé, permet d'expliquer ce phénomène. On peut alors distinguer deux types de parois : celles situées au niveau de la partie amont de chaque pore, non atteignables par les cellules en raison de la direction de l'écoulement, sur lesquelles la fonction $attach$ est donc nulle, et celles situées au niveau de

la partie aval de ces derniers, pour lesquelles la fonction $attach$ est supérieure à $0.85$. Dans ces conditions d'écoulement, il est donc très facile aux cellules de s'attacher à la paroi du biomatériau dès lors qu'elles entrent en contact avec cette dernière. De plus, en raison de la structure alvéolaire du matériau, le ratio $cell_{trav}(t) = cell_{ent}(t) \times S_{conn}/\left(S_{conn} + S_{att}\right)$, qui représente la fraction des cellules entrant dans un pore qui traversent ce dernier sans rencontrer de paroi, est inférieur à $10\%$. A la fin de l'étape d'ensemencement, l'échantillon simulé, représenté en coupe sur les figures 4.15.C, 4.15.D et 4.15.E, présente donc une distribution cellulaire très hétérogène. Pour améliorer l'efficacité du protocole d'ensemencement sans modifier la structure du biomatériau, il peut alors être intéressant d'augmenter le débit de fluide imposé à l'entrée de l'échantillon, et donc la vitesse moyenne du fluide en amont de ce dernier. Nous avons ainsi réalisé plusieurs calculs, en augmentant progressivement ce paramètre, afin d'étudier son effet sur la capacité d'adhésion des cellules et leur progression au sein du biomatériau. Les résultats de ces tests sont présentés sur la figure 4.16.

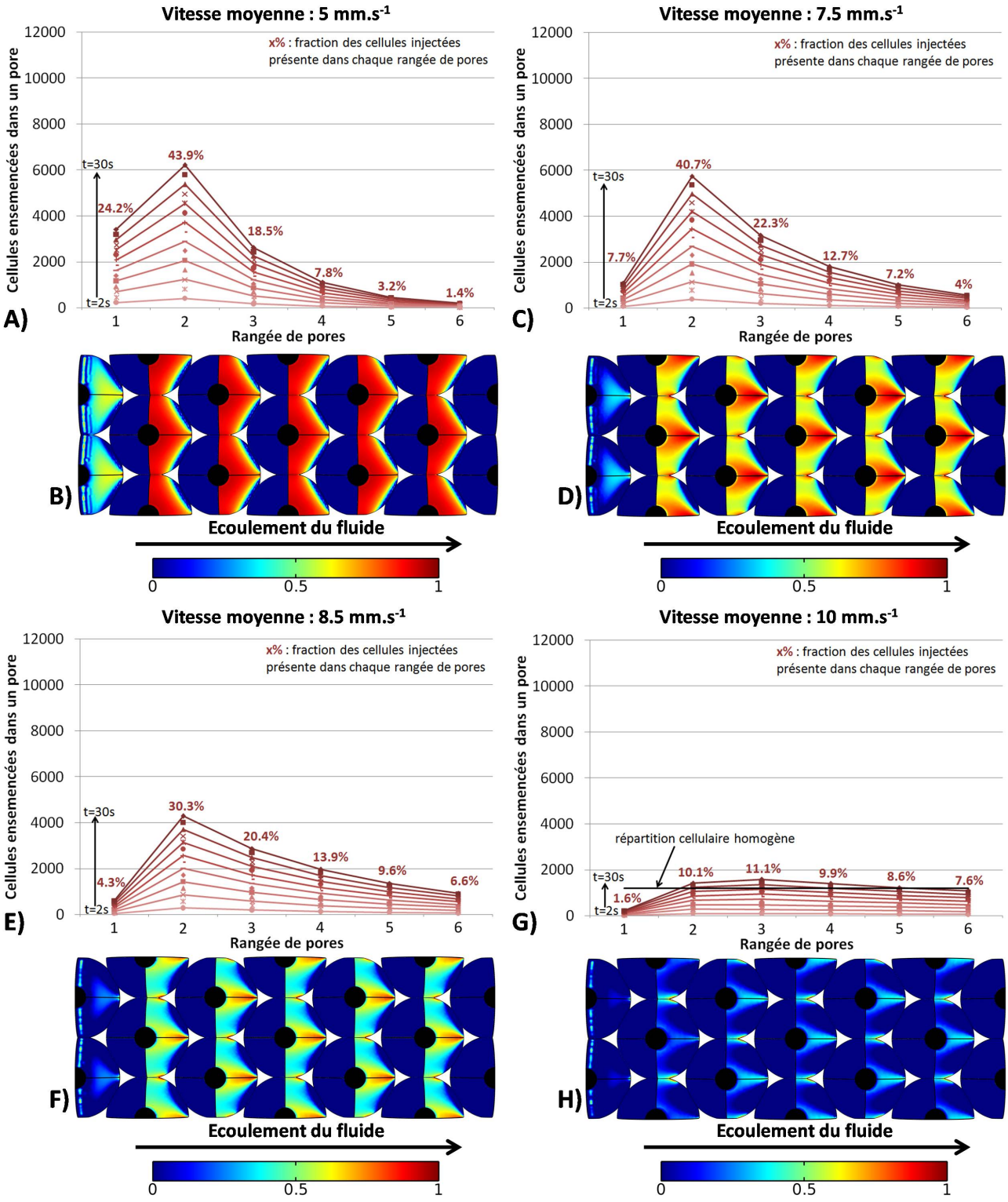



FIGURE 4.16 – Répartition cellulaire au sein de l'échantillon après simulation de la phase d'ensemencement, pour différentes vitesses moyennes du fluide imposées à l'entrée de l'échantillon : nombre de cellules ensemencées dans chaque rangée de pores au cours du temps (intervalle de temps entre deux simulations : 2s) pour une vitesse moyenne de : A) 5 mm.s$^{-1}$, C) 7.5 mm.s$^{-1}$ , E) 8.5 mm.s$^{-1}$ et G) 10 mm.s$^{-1}$. Les figures B), D), F) et H) présentent la valeur de la fonction $attach$ le long des parois à $t = 0$ pour les vitesses considérées respectivement sur les figures A), C), E) et G).

On observe alors une pénétration des cellules au sein du biomatériau d'autant plus importante que la vitesse moyenne d'entrée du fluide dans l'échantillon est élevée. Ainsi, pour une vitesse moyenne d'entrée du fluide de $5$ mm.s$^{-1}$ (figure 4.16.A), les cellules progressent jusqu'à la sixième rangée de pores, qui était hors d'atteinte lors des essais à $0.5$ mm.s$^{-1}$. De plus, la densité cellulaire maximale a été déplacée de la rangée 1 vers la rangée de pores 2. Néanmoins, près de $70\%$ des cellules restent dans les deux premières rangées de pores, et $20\%$ supplémentaires adhèrent aux parois de la troisième rangée, les $10\%$ restants étant répartis de façon dégressive sur les rangées 3 à 6. Pour des vitesses d'entrée du fluide comprises entre $7.5$ mm.s$^{-1}$ et $8.5$ mm.s$^{-1}$ (figures 4.16.C et 4.16.E), on constate une forte diminution des cellules présentes dans la première rangée de pore en fin d'ensemencement, la grande majorité des cellules se situant cette fois au niveau des rangées 2 et 3. On peut également remarquer que la différence de concentration cellulaire entre les rangées 2, 3 et 4 est moins marquée pour les tests réalisés à $8.5$ mm.s$^{-1}$ (figure 4.16.E). D'autre part, la fraction transmise à la partie non modélisée de l'échantillon (rangée 7 et au-delà) augmente avec la vitesse d'entrée du fluide, passant de $0\%$ à plus de $50\%$ quand la vitesse moyenne d'écoulement passe de $0.5$ mm.s$^{-1}$ à $10$ mm.s$^{-1}$.

Enfin, pour une vitesse moyenne d'écoulement de $10$ mm.s$^{-1}$ (figure 4.16.G), on observe des densités cellulaires similaires après ensemencement pour les rangées de pores 2 à 5. Cette densité est d'ailleurs proche de la densité cellulaire théorique à atteindre pour avoir un ensemencement cellulaire homogène dans l'échantillon. Seule la première rangée de pore n'est que très peu colonisée.

Cette évolution de la répartition cellulaire au sein de l'échantillon est directement reliée au cisaillement induit par l'écoulement du fluide au niveau des parois, *via* la fonction $attach$. La valeur de cette dernière ne dépend que très peu de la rangée de pore considérée : à l'exception de ceux de la première rangée, les pores de l'échantillon présentent des taux d'adhésion très similaires (figures 4.16.B, 4.16.D, 4.16.F et 4.16.H). Les pores de la rangée 1, situés sur la face amont de l'implant, subissent eux des sollicitations plus importantes, d'où les faibles taux d'attachement moyens relevés dans ces zones. Enfin, les zones favorables à l'adhésion cellulaire diminuent au fur et à mesure de l'augmentation de la vitesse moyenne d'écoulement, augmentant ainsi la progression moyenne des cellules au sein de l'échantillon.

Néanmoins, ces résultats ne prennent pas en compte les effets d'encombrement stérique in-

tervenant lors du passage des cellules à travers les connexions entre les pores, qui ralentissent leur progression. Ils offrent donc une estimation optimiste de la progression des cellules au sein du biomatériau. Dans ce cas, il semble malgré tout qu'une vitesse de l'ordre de $10$ mm.s$^{-1}$ soit nécessaire pour ensemencer de façon homogène l'échantillon considéré. Hors, de telles vitesses d'écoulement, vingt fois supérieures à celles utilisées lors des tests expérimentaux (voir chapitre 3), pourraient endommager les cellules. En effet, si le cisaillement évalué numériquement dans le cadre de ce modèle reste acceptable, ce dernier ne prend pas en compte les autres formes de sollicitations mécaniques engendrées par l'écoulement du fluide sur les cellules, qui peuvent entraîner des déformations importantes de ces dernières, menaçant ainsi leur intégrité.

## 4.4 Résultats pour l'étape de prolifération cellulaire

Nous avons ensuite étudié l'étape de prolifération cellulaire en considérant que les échantillons étaient soumis à un écoulement continu unidirectionnel de vitesse moyenne $V_{in} = 0.57$ mm.s$^{-1}$, qui correspond à un débit moyen de $1$ ml.min$^{-1}$ pour les échantillons étudiés. Pour évaluer l'impact de la répartition initiale des cellules sur le développement du futur tissu, nous nous sommes intéressés à deux distributions cellulaires : celle issue de l'ensemencement réalisé avec une vitesse moyenne d'écoulement de $5$ mm.s$^{-1}$, et celle qui serait obtenue avec un ensemencement "parfait" réalisé avec un flux unidirectionnel (*i.e.* tous les pores contenant le même nombre de cellules, réparties les parois atteintes par les cellules). On parlera dans ce cas de distribution *régulière*. La première distribution est donc obtenue avec une vitesse qui se situe déjà au-dessus des vitesses habituelles de perfusion utilisées pour l'ensemencement cellulaire de ce type d'échantillons [267], mais constitue un cas d'ensemencement non satisfaisant en raison de son hétérogénéité. Ce dernier reste cependant plus favorable que l'ensemencement réalisé à $0.5$ mm.s$^{-1}$ pour lequel le premier pore est rapidement obstrué. La deuxième, partant d'une densité cellulaire de $7.42 \times 10^8$ cellules.m$^{-2}$ (soit $645$ cellules/pore), permet d'évaluer l'impact de la structure des biomatériaux étudiés sur les conditions physico-chimiques de culture des cellules, indépendamment des difficultés liées à la phase d'ensemencement.

Les tests ont été conduits en suivant l'algorithme présenté au paragraphe 4.2.3 pour chaque distribution cellulaire, sur une durée de six jours à partir du début de la phase de prolifération. Les

résultats de ces études sont présentés sur la figure qui suit.

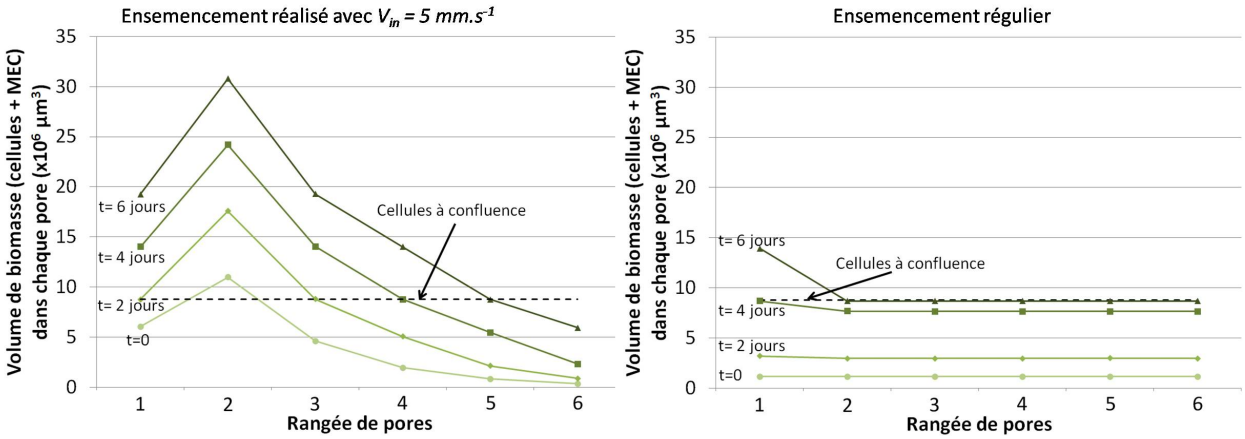



FIGURE 4.17 – Répartition de la biomasse (cellules + MEC) au sein de l'échantillon, après simulation de la phase de prolifération cellulaire pour deux distributions cellulaires initiales différentes : évolution du volume de biomasse dans chaque pore au cours du temps (intervalle de temps entre deux simulations : 2 jours). Figure de gauche : distribution cellulaire initiale obtenue après un ensemencement cellulaire réalisé à une vitesse moyenne d'écoulement de $5$ mm.s$^{-1}$. Figure de droite : distribution cellulaire initiale obtenue après un ensemencement régulier.

La figure 4.17 présente l'évolution du volume de biomasse (comprenant les cellules et l'éventuelle matrice extracellulaire (MEC)) au sein de chaque pore au cours du temps, en fonction de leur position (rangée) dans l'échantillon. Les courbes à $t = 0$ correspondent aux résultats des deux protocoles d'ensemencement considérés. Sur la figure de gauche, correspondant aux échantillons ensemencés à une vitesse d'écoulement moyenne de $5$ mm.s$^{-1}$, on retrouve ainsi le comportement particulier de la première rangée de pores, soumise à des cisaillements plus importants. On peut également observer que, dès l'ensemencement ($t = 0$ sur la figure), les pores de la deuxième rangée ont atteint une densité cellulaire $\sigma_{cell,p2} = 7.15 \times 10^9$ cellules.m$^{-2}$, dépassant ainsi le seuil de confluence cellulaire $\sigma_{conf}$. Par hypothèse, on considère donc que, dans ces derniers, la phase de prolifération est inhibée et que la croissance du volume de biomasse est uniquement due à la production de MEC. Par ailleurs, d'après les travaux de Nava et al. [196], il semble que le taux de production de MEC, à environnement physico-chimique fixé, soit proportionnel à la densité cellulaire. Pour cette rangée de pores, nous avons donc adapté le volume de MEC produit pendant un intervalle de temps, tel que

$$\Delta V_{MEC,p2} = \frac{\sigma_{cell,p2}}{\sigma_{conf}} \Delta V_{MEC} \sim 6.613 \times 10^{-12} \quad \text{m}^3 \tag{4.27}$$

pour les pores de la deuxième rangée, contre $\Delta V_{MEC} = 5.25 \times 10^{-12}$ m$^3$ pour un pore à confluence cellulaire (voir paragraphe 4.2.3). Par ailleurs, le caractère hétérogène de la distribution cellulaire initiale se conserve au cours de la phase de prolifération : ainsi, si la prolifération cellulaire s'arrête au bout de deux jours dans les rangées de pores 1 et 3, les pores de la rangée 6 n'atteignent pas le seuil de confluence cellulaire après six jours de culture. On assiste donc à un développement hétérogène du tissu au sein de l'échantillon, la production de MEC étant largement entamée après six jours de culture dans les pores situés dans la partie amont du domaine (rangées 1 à 3), mais absente du reste de ce dernier.

En revanche, pour une distribution cellulaire initiale régulière (figure de droite), la prolifération cellulaire s'effectue à des vitesses similaires dans l'ensemble des rangées de pores. Seule la première rangée se développe légèrement plus rapidement, en raison principalement de l'influence du cisaillement créé par l'écoulement du fluide (voir paragraphe suivant). On assiste donc, cette fois, au développement homogène du tissu souhaité au sein de l'échantillon.

Quelle que soit la distribution cellulaire initiale considérée, la fonction $prolif$, qui caractérise l'influence de l'environnement physico-chimique sur la prolifération cellulaire, reste supérieure à $1.4$ pour les pores n'ayant pas atteint le seuil de confluence cellulaire ($prolif\,(\tau, C_{ox}, C_{glu}) = 1$ correspondant au taux de prolifération de référence, observé lors d'une culture bidimensionnelle en boîte de Pétri). Les conditions physico-chimiques de culture semblent donc globalement favorables au développement cellulaire, les hétérogénéités constatées après six jours de culture correspondant à celles issues de la distribution cellulaire initiale.

Intéressons-nous à présent au rôle joué par chacune des trois variables environnementales étudiées dans le cadre de ce modèle : le niveau de cisaillement $\tau$, la concentration en oxygène $C_{ox}$ et celle en glucose $C_{glu}$. Les paragraphes suivants détaillent leur évolution au sein de l'échantillon après quatre jours de culture, *i.e.* lors du dernier intervalle de temps modélisé, ainsi que leur impact sur la prolifération cellulaire dans chaque rangée de pores.

### 4.4.1 Influence du cisaillement

Comme nous l'avons présenté au paragraphe 4.1.5, le cisaillement généré au voisinage des cellules, en stimulant ces dernières mécaniquement, a un impact sur leur vitesse de prolifération. En

évaluant la fonction $prolif_cisaill$, qui caractérise cette influence, le long des parois de l'échantillon étudié, on peut alors déterminer la nature et l'importance du rôle joué par cette stimulation mécanique sur le développement de la couche cellulaire au sein des parois du biomatériau considéré. La figure 4.18 présente les résultats obtenus pour la fonction $prolif_cisaill$ après quatre jours de culture.

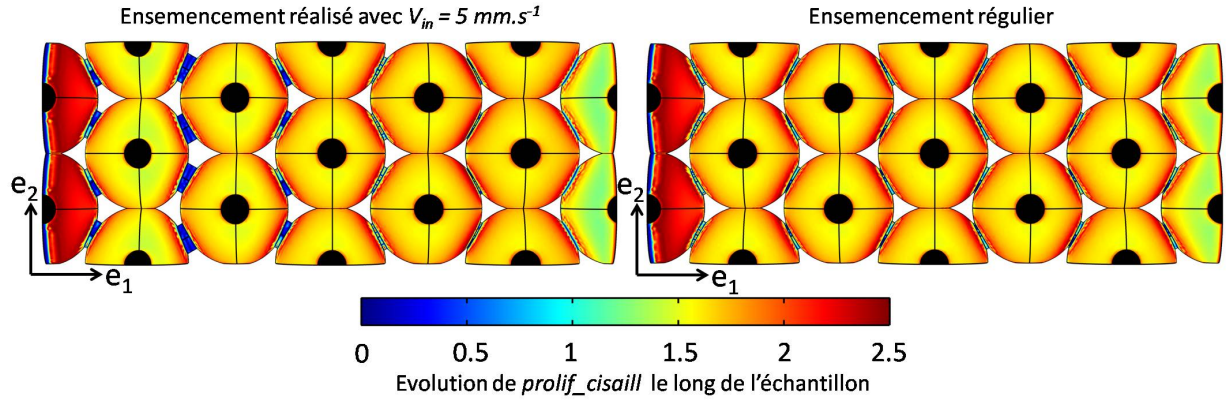



FIGURE 4.18 – Evaluation de la fonction $prolif_cisaill$ le long des parois de l'échantillon à l'instant $t = 4$ jours (écoulement continu unidirectionnel de vitesse moyenne en entrée $V_{in} = 0.57$ mm.s$^{-1}$. Figure de gauche : distribution cellulaire initiale obtenue après un ensemencement à vitesse d'écoulement moyenne $V_{in} = 5$ mm.s$^{-1}$. Figure de droite : distribution cellulaire initiale obtenue après un ensemencement régulier.

On peut alors remarquer une différence très nette entre les zones de connexion entre les pores, pour lesquelles $prolif_cisaill < 0.5$, et le reste des parois, où $prolif_cisaill$ reste supérieure à 1. Ceci s'explique par l'augmentation locale de la vitesse d'écoulement du fluide, due au rétrécissement important de la section du domaine de fluide au niveau de ces connexions. Par ailleurs, on observe des résultats similaires pour les rangées de pores 2 à 6 de l'échantillon issu de l'ensemencement régulier (figure de droite) et les rangées 4 à 6 de l'implant issu de l'ensemencement réalisé avec une vitesse de 5 mm.s$^{-1}$ : la fonction $prolif_cisaill$ est en moyenne supérieure à 1.5 pour chacun de ces pores, et présente des profils similaires d'un pore à l'autre. Dans les rangées de pores 2 et 3 de la figure de gauche (ensemencement réalisé à 5 mm.s$^{-1}$ ), pour lesquelles le volume de biomasse est plus important, modifiant ainsi la géométrie du domaine de fluide, on constate une légère baisse de cette moyenne, mais $prolif_cisaill$ reste néanmoins supérieure à 1 en dehors des zones de connexions. Seule la première rangée de pores présente un comportement différent vis-à-vis du cisaillement ($prolif_cisaill > 2$), en raison de sa position particulière dans l'échantillon (au niveau de la face amont, et donc soumise aux effets de bords). De même, sur la face aval

de l'implant (non colonisée par les cellules dans le cadre de ce modèle), la valeur $prolif_cisaill$ chute, même si elle reste en moyenne supérieure à 1. Ces conditions d'écoulement correspondent donc à une plage de cisaillement très favorable à la prolifération cellulaire.

### 4.4.2 Influence de la concentration en oxygène

Intéressons-nous à présent au transport de l'oxygène au sein du biomatériau lors de la mise en culture des échantillons. La figure 4.19 présente l'évolution de sa concentration au sein des implants étudiés après quatre jours de culture (figures 4.19.B et 4.19.D), ainsi que sa conséquence sur l'activité de prolifération des cellules (figures 4.19.A et 4.19.C).

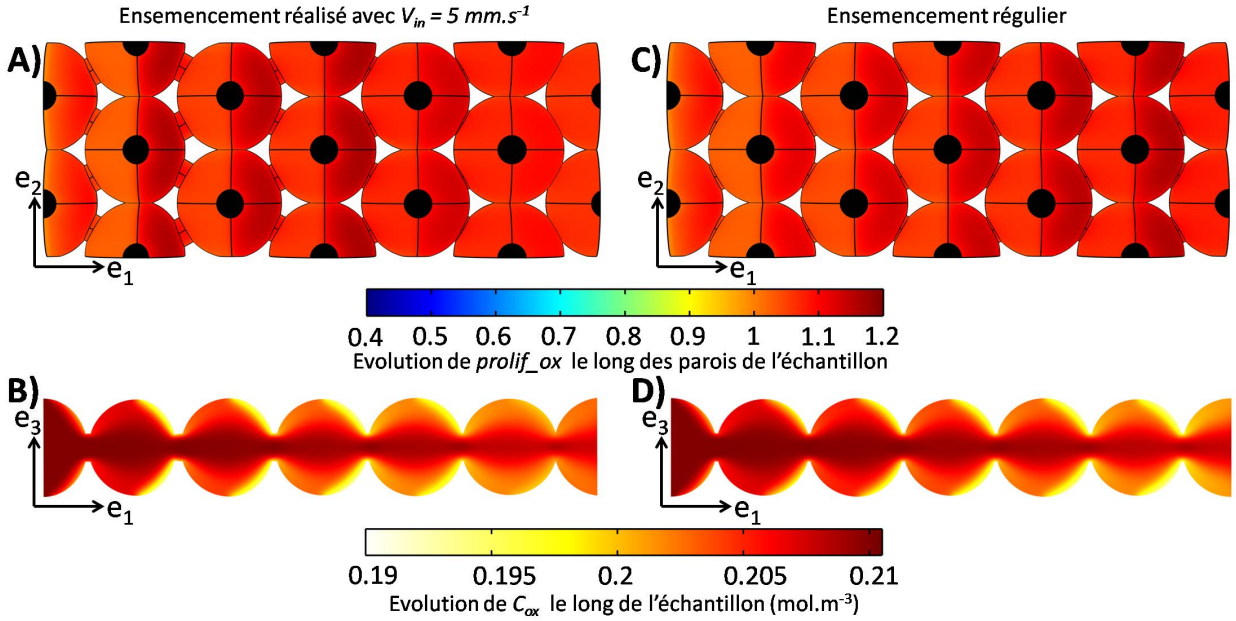



FIGURE 4.19 – Influence du transport de l'oxygène au sein de l'échantillon sur la prolifération cellulaire à l'instant $t = 4$ jours. A) : évaluation de $prolif_ox$ le long des parois de l'échantillon issu de l'ensemencement réalisé avec une vitesse moyenne d'écoulement de 5 mm.s$^{-1}$. B) : évolution de la concentration en oxygène $C_{ox}$ le long d'une coupe longitudinale de l'échantillon présenté en A). C) : évaluation de $prolif_ox$ le long des parois de l'échantillon issu de l'ensemencement régulier. D) : évolution de la concentration en oxygène $C_{ox}$ le long d'une coupe longitudinale de l'échantillon présenté en C).

On peut observer sur les figures 4.19.B et 4.19.D que les variations de la concentration en oxygène $C_{ox}$ par rapport la valeur de référence $C_{ox,0} = 0.21$ mol.m$^{-3}$ restent inférieures à $10\%$ sur l'ensemble de l'échantillon. On peut par ailleurs distinguer deux types de variations pour cette concentration : un gradient local au voisinage des parois colonisées par les cellules, d'autant plus marqué que la densité cellulaire est importante, et une diminution plus progressive de la valeur

moyenne de $C_{ox}$ dans le volume des pores lorsqu'on progresse le long de l'échantillon selon la direction $\overrightarrow{e_1}$.

Les figures 4.19.A et 4.19.C indiquent quant à elles que, quelle que soit la distribution cellulaire initiale, la fonction $prolif_ox$, qui caractérise l'influence de $C_{ox}$ sur la prolifération cellulaire, reste comprise entre $1$ et $1.2$ le long des parois des échantillons étudiés. Il semble donc que les phénomènes de transport de l'oxygène au sein des implants permettent un apport satisfaisant de ce dernier au voisinage des cellules. Les valeurs les plus élevées de ce champ correspondent aux zones où $C_{ox}$ est la plus faible ($C_{ox} \sim 0.19$ mol.m$^{-3}$). En effet, comme indiqué au paragraphe 4.1.5, les cellules souches mésenchymateuses prolifèrent plus rapidement lorsque la concentration en oxygène diminue (l'optimum étant atteint pour $C_{ox} \sim 0.04$ mol.m$^{-3}$, valeur en-dessous de laquelle le manque d'oxygène devient dommageable pour les cellules). On peut alors remarquer des tendances différentes entre les deux échantillons étudiés : pour l'échantillon obtenu à partir d'un ensemencement régulier (figure 4.19.C), les parois présentant les valeurs les plus élevées de $prolif_ox$ (et donc la concentration en oxygène locale la plus faible) sont situées dans les pores des rangées $5$ et $6$, alors que pour l'échantillon obtenu à partir de l'ensemencement réalisé à $5$ mm.s$^{-1}$ (figure 4.19.A), elles se trouvent au niveau des rangées $2$ à $4$. Dans le premier cas, la densité cellulaire (et donc le taux de consommation d'oxygène) est similaire dans l'ensemble des pores de l'échantillon. La diminution de la valeur de $C_{ox}$ au voisinage des parois des rangées de pores situées en aval de l'échantillon n'est donc pas liée à une consommation locale plus importante, mais à un appauvrissement du fluide en oxygène au fur et à mesure que ce dernier progresse dans l'échantillon, en raison de la consommation des cellules situées dans chaque rangée de pores. Dans le deuxième cas en revanche (figure 4.19.A), la densité cellulaire est plus importante dans les quatre premières rangées de pores (qui ont atteint le seuil de confluence à $t = 4$ jours) que dans les deux dernières. La diminution de $C_{ox}$ au voisinage des parois des ces premières rangées est donc due à une consommation locale importante. Enfin, si cette consommation entraîne bien un appauvrissement global du fluide en oxygène (visible sur la figure 4.19.B), ce dernier est compensé par la faible densité cellulaire présente, notamment, dans la sixième rangée de pore, d'où une concentration en oxygène plus importante au voisinage des parois de cette dernière.

### 4.4.3 Influence de la concentration en glucose

Le transport du glucose, choisi ici comme nutriment modèle, influence également la vitesse de prolifération cellulaire au sein des échantillons. De manière similaire aux résultats présentés dans le paragraphe précédent, la figure 4.20 présente l'évolution de la concentration en glucose au sein de l'échantillon après quatre jours de culture, ainsi que son influence sur l'activité des cellules.

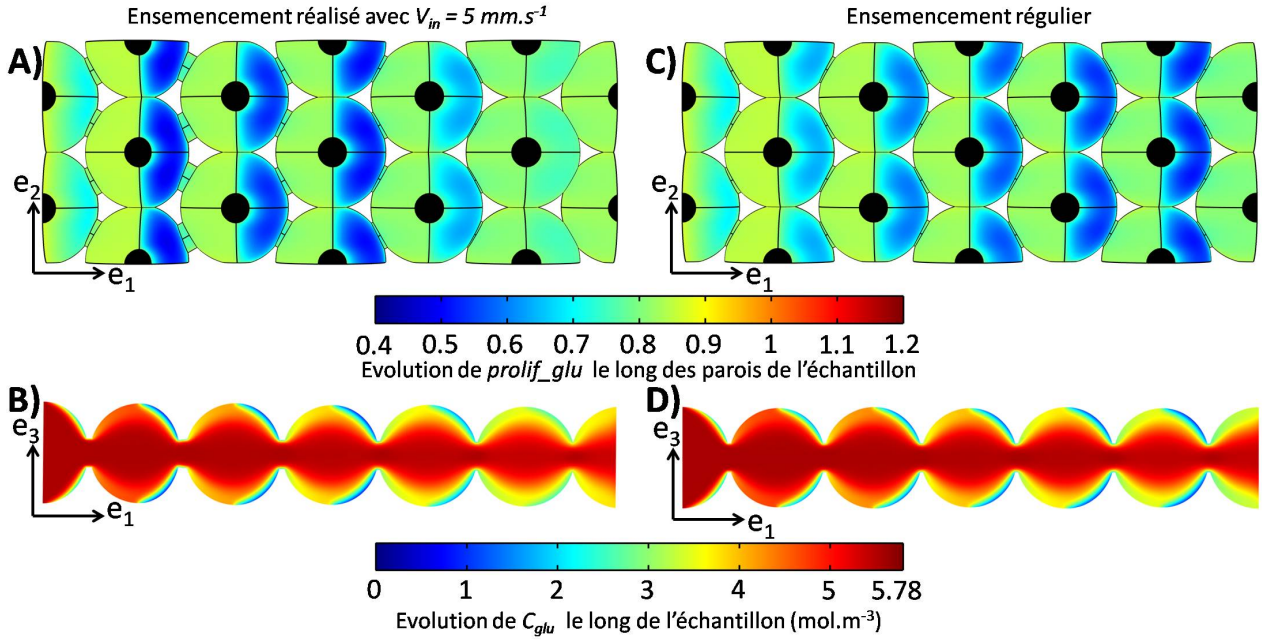



FIGURE 4.20 – Influence du transport du glucose au sein de l'échantillon sur la prolifération cellulaire à l'instant $t = 4$ jours. A) : évaluation de $prolif_glu$ le long des parois de l'échantillon issu de l'ensemencement réalisé avec une vitesse moyenne d'écoulement de $5$ mm.s$^{-1}$. B) : évolution de la concentration en glucose $C_{glu}$ le long d'une coupe longitudinale de l'échantillon présenté en A). C) : évaluation de $prolif_glu$ le long des parois de l'échantillon issu de l'ensemencement régulier. D) : évolution de la concentration en oxygène $C_{glu}$ le long d'une coupe longitudinale de l'échantillon présenté en C).

Si la concentration en oxygène varie peu au sein des deux échantillons étudiés, la concentration en glucose $C_{glu}$ présente elle des variations importantes, notamment aux abords des parois colonisées par les cellules. Ainsi, la plage de concentrations relevée sur chacun des échantillons s'étend de $0.78$ mol.m$^{-3}$ à $5.78$ mol.m$^{-3}$ (la valeur de référence en entrée de chaque implant étant $5.55$ mol.m$^{-3}$). On peut de plus observer que la couche de fluide appauvrie en glucose ($C_{glu} \leq 4$ mol.m$^{-3}$) devient de plus en plus importante en progressant vers la face aval des échantillons (figures 4.20.B et 4.20.D).

Pour expliquer ce comportement, il convient tout d'abord de vérifier que le transport global du

glucose au sein de l'échantillon est suffisant pour maintenir une concentration en glucose constante au centre des pores (*i.e.* loin des zones de consommation) tout au long de l'échantillon. Le nombre de Péclet $Pe$ macroscopique associé à ce système valant

$$Pe \equiv \frac{V_{in}L}{D_{glu}} \sim \frac{5.7 \times 10^{-4} \times 4.02 \times 10^{-3}}{5 \times 10^{-10}} \sim 4.58 \times 10^{3} \tag{4.28}$$

avec $L = 4.02$ mm la longueur de l'échantillon modélisé, le transport du glucose au sein de l'échantillon est principalement convectif. La quantité de glucose advectée résultant de ce transport convectif vaut alors

$$q_{glu,entrant} = C_{glu}Q \sim 9.25 \times 10^{-8} \text{ mol.s}^{-1} \tag{4.29}$$

avec $Q = 1$ ml.min$^{-1}$ le débit de fluide imposé à l'entrée de l'échantillon. Pour un pore ayant atteint le seuil de confluence, le taux de consommation total de glucose vaut quant à lui

$$q_{glu,conso} = R_{max,glu}N_{cell} \sim 4.46 \times 10^{-11} \text{ mol.s}^{-1} \tag{4.30}$$

où $N_{cell} = \sigma_{conf}S_{att} = 4955$ cellules correspond au nombre de cellules présentes dans un pore ayant atteint le seuil de confluence. L'apport global de glucose est ainsi supérieur de trois ordres de grandeur au taux de consommation cellulaire correspondant, et serait donc suffisant pour assurer une concentration stable au centre des pores, quelle que soit leur position au sein de l'échantillon.

En revanche, le transport du glucose du centre d'un pore vers sa périphérie (et donc vers les cellules) est assuré soit par diffusion, soit *via* des écoulements secondaires qui génèrent un champ de vitesses $\overrightarrow{v_T}$ dans le plan transverse à la direction de l'écoulement principal [204]. Dans le cas du système étudié, la valeur moyenne $v_{T,moy}$ de la norme de cette vitesse, mesurée à partir de champ de vitesses simulé numériquement, est d'environ $5.9 \times 10^{-6}$ m.s$^{-1}$. Par ailleurs, la valeur moyenne $v_{D,moy}$ de la norme de la vitesse apparente du glucose liée aux phénomènes de diffusion peut être estimée selon [204]

$$v_{D,moy} = \frac{D_{glu}}{R_p} \sim 1.2 \times 10^{-6} \text{ m.s}^{-1} \tag{4.31}$$

avec $R_p = 400$ $\mu$m le rayon initial des pores. Le rapport des vitesses $v_{T,moy}$ et $v_{D,moy}$ permet alors, de manière similaire au nombre de Péclet pour l'écoulement principal, de comparer les

contributions des effets convectifs et diffusifs sur le transport du glucose au voisinage des parois. On obtient ainsi

$$\frac{v_{T,moy}}{v_{D,moy}} \sim 4.9 \tag{4.32}$$

Les effets convectifs liés au champ de vitesses secondaire sont donc supérieurs aux effets diffusifs, bien que ces deux contributions soient cette fois du même ordre de grandeur. En introduisant le nombre de Damkölher [204], on peut alors comparer les temps caractéristiques du transport convectif du glucose vers les parois (lié à $\overrightarrow{v_T}$) et de son absorption par les cellules selon

$$Da = \frac{\sigma_{cell} R_{glu,max}}{C_{glu} v_{T,moy}} \sim \frac{5.68 \times 10^9 \times 9 \times 10^{-15}}{5.55 \times 5.9 \times 10^{-6}} \sim 1.56 \tag{4.33}$$

Ainsi, même si l'apport de glucose au cœur des pores est suffisant dans l'ensemble de l'échantillon, la vitesse de consommation cellulaire du glucose est légèrement supérieure à la vitesse de transport de ce dernier du centre des pores vers les parois, d'où un appauvrissement en glucose de la couche de fluide située au voisinage de ces dernières au fur et à mesure que l'on progresse vers la face aval de l'échantillon.

Cet appauvrissement local en glucose est peu favorable à la prolifération cellulaire : la fonction $prolif_glu$, qui caractérise l'impact de la concentration en glucose sur cette dernière, varie en effet entre $0.4$ et $0.9$ pour chacun des échantillons étudiés, les zones de faible concentration en glucose correspondant aux zones de faible prolifération. Ces dernières correspondent d'ailleurs aux parois à faible concentration en oxygène. On retrouve ainsi le phénomène de concurrence entre apports chimiques et densité cellulaire observé au paragraphe 4.4.2 pour l'ensemencement réalisé à $5$ mm.s$^{-1}$. Le transport du glucose à travers l'implant semble donc être le phénomène limitant dans le développement des deux échantillons étudiés. En effet, même dans le cas d'un ensemencement régulier, sa concentration au niveau des parois colonisées par les cellules chute de manière importante dès la cinquième rangée de pores (soit à une profondeur de $3.35$ mm environ), située au tiers de la longueur des échantillons testés expérimentalement.

## 4.5 Conclusion et perspectives

D'après les résultats obtenus au paragraphe 4.3, la structure alvéolaire des échantillons étudiés semble être peu adaptée à un ensemencement cellulaire homogène en volume, en raison notamment du faible parcours moyen des cellules avant leur rencontre avec les parois du biomatériau. Pour éviter une adhésion massive des cellules dans les deux premières rangées de pores, il est alors nécessaire d'utiliser des vitesses d'écoulement élevées, qui peuvent se révéler dangereuses pour la survie cellulaire. La progression des cellules au sein de l'échantillon pourrait en revanche être facilitée à moindre vitesse d'écoulement, en modifiant la géométrie des pores, pour éviter les rétrécissements brutaux de la section du domaine de fluide (observés au niveau des connexions entre pores), qui favorisent un contact précoce des cellules avec la paroi du biomatériau.

Les conséquences d'un ensemencement hétérogène sur la première phase de développement du tissu peuvent être observées lors de la simulation de la prolifération cellulaire au sein d'un échantillon ensemencé à une vitesse moyenne de $5$ mm.s$^{-1}$. On constate alors un gradient de développement le long de la direction principale de l'écoulement : les pores situés en amont, pour lesquels la densité cellulaire initiale est élevée, atteignent rapidement le seuil de confluence cellulaire, et se remplissent progressivement de matrice extracellulaire. Les pores situés au-delà de la quatrième rangée, en revanche, sont toujurs dépourvus de MEC après six jours de culture. Notons de plus que le cas étudié ici, bien que non optimal, représente déjà une estimation doublement optimiste de l'évolution des échantillons. Au niveau de l'ensemencement tout d'abord, la vitesse moyenne utilisée ici se situe au-dessus de la plage de valeurs utilisée dans la littérature. Bien que non satisfaisante, la distribution initiale de cellules est donc meilleure que celle obtenue lors des tests expérimentaux, qui conduirait à un bouchage rapide de la première rangée de pores. Au niveau de la phase de prolifération ensuite, l'obstruction progressive des connexions entre pores due à la production de MEC n'est pas prise en compte dans ce modèle. Or, cette dernière rend le transport de l'oxygène et du glucose plus difficile, et pourrait donc diminuer fortement le taux de prolifération cellulaire observé dans les pores situés en aval de l'échantillon, accentuant le gradient de développement constaté le long des implants.

Dans le cas d'un ensemencement régulier, la simulation des six premiers jours de culture a permis de mettre en évidence, malgré un développement homogène du tissu au sein du biomatériau,

un facteur limitant lié au transport du glucose du centre des pores vers leurs parois, et donc vers les zones contenant les cellules. Il est raisonnable de penser que ce phénomène est accentué lors la production de MEC qui suit la phase de prolifération, en raison d'une part de l'obstruction progressive des connexions entre les pores, et d'autre part de l'apparition d'une nouvelle phase poreuse à traverser pour atteindre les cellules. Pour rendre compte de façon plus précise de cette phase de développement des échantillons, il conviendrait de modéliser les mécanismes qui régulent la production de matrice extracellulaire, qui constitue un type d'activité cellulaire différent de la prolifération. Dans ce cas, l'évaluation du cisaillement généré au niveau de la membrane cellulaire doit être modifié : en effet, les cellules se trouvant alors dans une matrice dont les fibres sont reliées au cytosquelette, l'écoulement du fluide au sein de cette dernière entraîne de nouvelles sollicitations mécaniques sur les cellules, et donc des réponses différentes de celles observées en l'absence de MEC. Il convient alors de prendre en compte une nouvelle échelle : celle de l'espace entre les fibres péricellulaires [279, 105]. De plus, le transport de l'oxygène et du glucose se trouve modifié aux abords des cellules, car ce dernier doit s'effectuer à travers la matrice fibreuse formée. Les phénomènes de transport au sein de telles matrices sont en particulier mal connus pour le glucose, pour lequel de nombreux paramètres sont indéterminés. Il faudrait donc réaliser divers tests expérimentaux pour évaluer la capacité de cette molécule à progresser au sein de telles matrices, ou modéliser ses interactions avec cette dernière – entrant alors dans le domaine de la dynamique moléculaire.

Néanmoins, le transport du glucose du centre des pores vers leurs parois pourrait être amélioré en adoptant une texture du biomatériau qui permette d'obtenir un champ de vitesses secondaire $\overrightarrow{v_T}$ satisfaisant, sans nécessiter un débit de fluide délétère pour les cellules. En effet, le rayon de courbure $r_C$ des lignes de courant de l'écoulement principal peut être relié à la vitesse secondaire moyenne $v_{T,moy}$ selon [204]

$$v_{T,moy} = \frac{Pe \times Re \times v_{D,moy} R_p}{r_C} \tag{4.34}$$

d'où

$$r_C = \frac{Pe \times Re \times v_{D,moy} R_p}{v_{T,moy}} = \frac{Pe \times Re \times D_{glu}}{v_{T,moy}} = \frac{{V_{in}}^2 L R_p}{\mu_f v_{T,moy}} \tag{4.35}$$

avec $Re$ le nombre de Reynolds associé au système. Pour une structure alvéolaire et une vitesse

moyenne d'écoulement de $0.57$ mm.s$^{-1}$, on a ainsi $r_C \sim 1.47 \times 10^{-2}$ m, qui est supérieur à la longueur de l'échantillon. En adoptant une structure géométrique des pores du biomatériau qui permette de diminuer $r_C$, à taille de pore $R_p$ fixée, il serait alors possible d'augmenter la valeur de $v_{T,moy}$ et ainsi, à écoulement fixé, d'améliorer le transport des espèces chimiques vers les parois des pores, et donc vers les zones où se trouvent les cellules.

Finalement, d'après les résultats de cette première étude, il semble qu'une structure poreuse satisfaisante pour ce type de biomatériaux devrait être composée de pores sans restriction brutale de section (pour faciliter la progression des cellules lors de l'ensemencement), entièrement connectés (pour éviter l'apparition de "zones mortes"), et permettant d'obtenir des lignes de courant du fluide à faible rayon de courbure (pour maximiser le transport des espèces chimiques vers les interfaces fluide/solide). Ces tendances pourront être précisées lors de travaux futurs, en complétant ce modèle pour prendre en compte certains phénomènes non pris en compte ici (migration et mort cellulaires, mécanismes de production de MEC, effets stériques) et intégrer les étapes ultérieures de développement des implants.

# Chapitre 5

# Etude des propriétés de transport du périoste

Le périoste constitue une barrière protectrice du système osseux en contrôlant ses échanges de masse, de charges et de cellules avec le milieu extérieur environnant (voir chapitre 1). Plus généralement, la régulation de ces types d'échanges est à la base de mécanismes essentiels à la survie des êtres vivants, tels que le maintien de l'homéostasie entre les différents systèmes de l'organisme et la protection de ce dernier face aux agressions extérieures. Parmi les phénomènes physico-chimiques à l'origine de cette régulation, il semble que l'osmose, l'électro-osmose, les gradients de pression, les tensions de surface et le transport actif d'ions jouent un rôle important dans le transport de masse à travers différentes membranes biologiques telles que le péritoine [12], la barrière hémato-encéphalique [262], la cornée [230] ou la membrane nucléaire [13]. En conséquence, ces dernières ont un comportement hydrique asymétrique : leur perméabilité dépend de l'espèce chimique considérée et de la direction du transport.

Dans le cas du périoste, il semble que ces phénomènes jouent un rôle primordial lors du processus de cicatrisation osseuse (voir paragraphe 1.3). De récentes techniques chirurgicales utilisent d'ailleurs la capacité du périoste à favoriser la régénération osseuse pour prendre en charge des lésions osseuses importantes (voir paragraphe 1.5).

Néanmoins, les propriétés de transport au sein du périoste sont encore mal connues. Une détermination plus précise de ces dernières pourrait donc améliorer la compréhension du processus de cicatrisation osseuse et, à terme, permettre de mettre au point une membrane artificielle aux pro-

priétés semblables, afin de s'affranchir des limitations (de taille notamment) liées aux protocoles chirurgicaux actuels.

Diverses études récentes de caractérisation du périoste ont permis de montrer que :

- le tissu osseux possède une concentration plus élevée en électrolytes que le plasma sanguin [129]. Il est alors raisonnable de penser que le périoste participe au maintien de ce gradient de concentration ;
- le périoste est un matériau anisotrope (présentant un module d'élasticité cinq fois plus élevé dans la direction axiale que dans la direction transverse) et est fortement précontraint *in situ*. En effet, on observe un fort rétrécissement de cette membrane lorsqu'on la détache de l'os sous-jacent [183] ;
- un échantillon de périoste plongé dans du tampon phosphate salin (PBS) gonfle [183], ce qui traduit une sensibilité à la pression osmotique ;
- la perméabilité intrinsèque du périoste dépend de la direction et de la vitesse moyenne de l'écoulement fluide le traversant [69].

Ces observations ne sont pas prises en compte dans les approches classiques d'étude de la cicatrisation osseuse, dans lesquelles le périoste est représenté soit par une barrière imperméable [88, 154], soit par une membrane semi-perméable permettant aux cellules de migrer des muscles environnants vers le tissu osseux après un traumatisme [133, 221], afin de faciliter le processus de cicatrisation. Ces modèles font donc abstraction de la capacité particulière du périoste à s'adapter à son environnement physico-chimique, pourtant essentielle pour caractériser le rôle de cette membrane au sein de l'évolution du système osseux. En particulier, en raison de la variabilité des contraintes mécaniques locales appliquées au tissu osseux en fonction de la position anatomique de ce dernier, il est raisonnable de penser que les caractéristiques du périoste, et donc ses propriétés de transport, dépendent du site anatomique étudié.

Le professeur Melissa L. Knothe Tate (BME Department, Case Western University, Cleveland, Ohio, USA), a mené, avec son équipe, de nombreuses études récentes pour caractériser les propriétés hydro-mécaniques du périoste, et ainsi améliorer la compréhension des mécanismes physico-chimiques à l'origine de son comportement singulier [133, 69, 183, 129, 182, 135]. Dans le cadre d'une collaboration entre le professeur Knothe Tate et notre laboratoire, j'ai ainsi eu l'occasion d'effectuer une mission de trois mois au sein de son équipe, à laquelle ce dernier chapitre

est consacré, afin de déterminer expérimentalement l'influence du site anatomique de prélèvement et de la salinité de la solution perfusante sur la perméabilité intrinsèque du périoste fémoral ovin.

Pour cela, le protocole expérimental utilisé est exposé dans un premier paragraphe, suivi des résultats expérimentaux obtenus. Enfin, le troisième paragraphe comporte un ensemble d'hypothèses explicatives relatives aux comportements observés, afin d'orienter la mise en place d'études complémentaires à venir dans la caractérisation des mécanismes à l'origine du comportement particulier du périoste.

## 5.1 Matériel et méthodes

Les tests de mesure de perméabilité du périoste sont réalisés en perfusant les échantillons avec un électrolyte de façon unidirectionnelle et à vitesse constante, et en mesurant la force de résistance générée par le périoste en réponse à cette sollicitation. En faisant varier le site anatomique de prélèvement, l'orientation des échantillons et la composition de la solution ionique perfusante, on peut alors déterminer l'influence de ces trois paramètres sur le comportement hydrique de cette membrane.

### 5.1.1 Préparation des solutions à perfuser

Les propriétés de gonflement du périoste, observées dans l'étude de McBride et al. [183], nous conduisent à penser que la pression osmotique de Donnan a vraisemblablement une influence sur les propriétés de transport hydraulique de cette membrane, comme c'est le cas pour d'autres types de matériaux. Ainsi, il apparaît par exemple que la pression osmotique due aux effets de répulsion électrostatiques à l'échelle manométrique de la MEC, ainsi que les interactions électro-chimiques concomitantes, modifient fortement le comportement du tissu cartilagineux [33, 77, 78]. Cette pression de gonflement étant largement dépendante de la force ionique du fluide saturant le milieu [151], nous avons choisi d'utiliser trois types de solution perfusante pour réaliser les tests de perméabilité conduits dans le cadre de cette étude, chacune possédant une concentration ionique différente. Nous avons pour cela pris comme solution de référence la solution de tampon phosphate salin (PBS), solution isotonique largement utilisée pour le maintien en milieu humide des tissus vivants, et utilisée lors d'une étude précédente de perméabilité du périoste menée par l'équipe du

professeur Knothe Tate [69]. Cette solution est obtenue en dissolvant $2.97$ mM [1] de heptahydrate de phosphate disodique ($NaHPO_4-H_2O$, SIGMA®, S−9390), $1.06$ mM de potassium de phosphate monobasique ($H_2KPO_4$, SIGMA®, P−9791) et $155.17$ mM de chlorure de sodium (NaCl, SIGMA®, S−7653) dans de l'eau distillée. Les deux autres solutions ont été choisies à partir de cette solution de référence, en divisant – respectivement en multipliant – la concentration de référence de chlorure de sodium par deux, pour obtenir une solution hypotonique – respectivement hypertonique, contenant donc $77.585$ mM – respectivement $310.34$ mM – de chlorure de sodium, les autres solutés étant maintenus à leur concentration de référence.

Les trois électrolytes ainsi formés ont ensuite été conservés à température ambiante jusqu'à la réalisation des essais.

### 5.1.2 Préparation des échantillons

Les échantillons de périoste utilisés dans cette étude ont été prélevés sur des fémurs de moutons adultes de boucherie réfrigérés ($4$ à $7^{\circ}C$), mais non congelés. Des tests complémentaires mettant en évidence l'influence du processus de congélation sur le comportement du périoste, présentés dans l'annexe E, ont en effet permis de montrer que le caractère directionnel des échanges chimiques observé sur les échantillons réfrigérés disparaît après congélation. Une fois le fémur à température ambiante (environ $20^{\circ}$C), le tissu musculaire recouvrant la zone à prélever est délicatement retiré. Un anneau plat rigide (diamètre intérieur $10$ mm, diamètre extérieur $20$ mm) est ensuite collé au périoste ainsi mis à nu (Super Glue Extra Time Control™, Loctite®), avant que ce dernier ne soit détaché de l'os sous-jacent. Le rôle de cet anneau est de maintenir l'échantillon de périoste à sa taille *in situ*, et d'essayer de préserver ainsi la précontrainte existant *in vivo*. De plus, afin de limiter les effets de désaturation, le périoste est régulièrement humidifié avec du PBS durant l'ensemble du protocole, et les tests de perméabilité sont réalisés dans les cinq minutes suivant le prélèvement de chaque échantillon.

Remarque : Comme mentionné en introduction de ce chapitre, la concentration en électrolytes du périoste est supérieure à celle des tissus environnants, et donc à celle des différentes solutions utilisées lors de ces tests. Les échantillons ne sont donc pas à l'équilibre chimique lors de ces essais. Néanmoins, une étude précédente menée par McBride et al. [183] a montré que les phénomènes de

1. la notation mM, usuelle en chimie, correspond à l'unité $10^6$ mol.m−3.

gonflement associés à ce retour à l'équilibre avaient un temps caractéristique de l'ordre de l'heure. Les tests menés ici ayant une durée de 5 min environ, nous supposerons que ce phénomène n'a que peu d'impact sur les mesures réalisées.

Cette étude est centrée autour de trois paramètres, dont les valeurs sont regroupées dans le tableau 5.1 : le site anatomique de prélèvement de l'échantillon de périoste, la concentration ionique de la solution perfusée et la direction de perfusion. Ces paramètres ont été modifiés un à un, en maintenant les autres à leur valeur de référence.

| Paramètres | Valeurs |
|---|---|
| Site anatomique de prélèvement | {Médial, **Antérieur**, Latéral} |
| Niveau de concentration | {Hypotonique, **Isotonique (PBS)**, Hypertonique} |
| Direction de perfusion | {os→muscle, muscle→os} |

TABLE 5.1 – Paramètres étudiés pour caractériser les propriétés de perméabilité du périoste. Ces derniers ont été modifiés un à un, les autres étant maintenus à leur valeur de référence (en gras dans le tableau).

Chaque combinaison de paramètres a été testée sur 5 échantillons provenant de fémurs différents. Au total, un ensemble de 50 échantillons, provenant de 11 fémurs distincts, a donc été utilisé. Chaque fémur a ainsi été prélevé plusieurs fois, comme schématisé sur la figure 5.1.

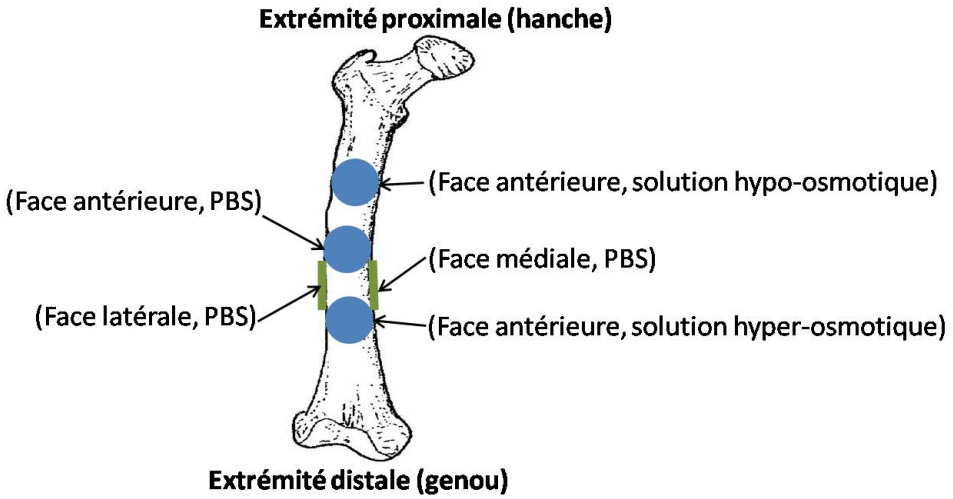



FIGURE 5.1 – Représentation schématique des différents sites anatomiques de prélèvement utilisés. Chaque fémur a ainsi été prélevé au maximum cinq fois. Les niveaux de concentration des solutions perfusantes sont également précisés.

### 5.1.3 Tests de perméabilité

Une fois les échantillons prélevés et leur épaisseur mesurée à l'aide d'un palmeur, ils sont placés dans un dispositif dédié, décrit sur la figure 5.2, qui permet d'imposer un écoulement de fluide à travers la membrane à une vitesse constante de $5 \times 10^{-5}$ m.s$^{-1}$ pendant $200$ s, soit sur une distance de $1$ cm. Ce dispositif est composé d'un réservoir cylindrique (de diamètre $9$ mm et de hauteur $7.62$ cm) saturé avec la solution souhaitée, couplé à un piston de seringue (BD Safety-Lok Syringe, polycarbonate) à l'une de ses extrémités. L'échantillon de périoste est alors placé à l'autre extrémité du cylindre de fluide, et maintenu au contact de ce dernier à l'aide d'un support vissé au réservoir, percé d'un trou de diamètre $9$ mm pour permettre l'écoulement du fluide après la traversée du périoste. Enfin, un ensemble de joints toriques assure l'étanchéité de l'ensemble du système.

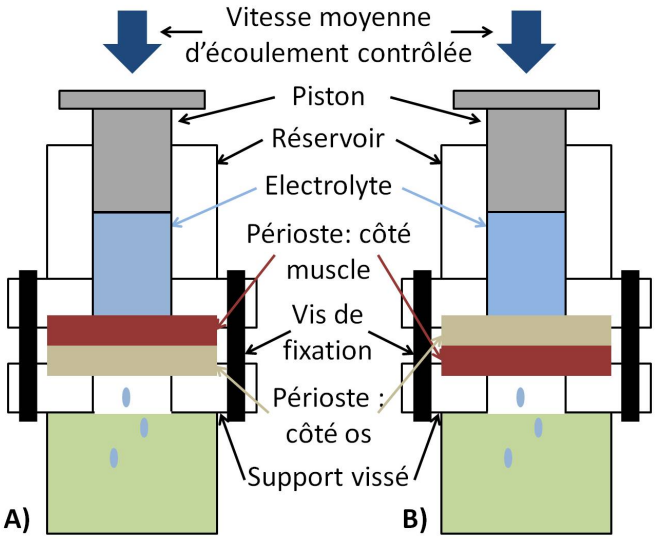



FIGURE 5.2 – Dispositif expérimental de mesure de la perméabilité intrinsèque du périoste. L'échantillon à tester (beige et rouge) est placé entre deux anneaux de PMMA (en blanc), sous le réservoir de fluide (bleu), selon l'orientation souhaitée. On impose ensuite le déplacement du piston (gris) à vitesse constante, pour forcer l'écoulement du fluide à travers le périoste. Un capteur permet alors de mesurer la force de réaction exercée par l'ensemble fluide/échantillon sur le piston.

Ce montage est ensuite placé dans un appareil de test mécanique (Enduratec ELF 3200, Bose Co, Eden Prairie, Minnesota, USA), afin de contrôler la vitesse de descente du piston d'une part, et de mesurer la force de résistance $\overrightarrow{F_R}$ générée par le système au niveau de ce dernier d'autre part. La perméabilité intrinsèque $\kappa$ de l'échantillon est alors déduite de cette dernière d'après la loi de

Darcy [55], selon

$$\kappa \equiv \frac{\left\|\overrightarrow{V_{in}}\right\| S \mu_f L}{\left\|\overrightarrow{F_R}\right\|} \tag{5.1}$$

avec $\left\|\overrightarrow{V_{in}}\right\|$ la vitesse moyenne d'écoulement imposée par le piston, $S$ la surface de l'échantillon traversé par le fluide, $L$ l'épaisseur de l'échantillon et $\mu_f$ la viscosité dynamique des solutions perfusantes.

Une fois l'ensemble des tests effectué, une étude statistique a été conduite pour déterminer le caractère significatif des tendances observées, en utilisant un test de Student pour deux populations indépendantes ($n = 5$ par groupe, Minitab, State College, PA, USA).

## 5.2 Résultats

### 5.2.1 Influence du site anatomique de prélèvement

Intéressons-nous dans un premier temps à l'influence du site anatomique de prélèvement sur la perméabilité intrinsèque $\kappa$ des échantillons. La figure 5.3 regroupe les résultats obtenus pour les différents essais réalisés en perfusant du PBS (solution isotonique) à travers des prélèvements de périoste provenant des faces médiale, antérieure ou latérale des fémurs traités, et en faisant varier l'orientation de ces derniers (écoulement du fluide de l'os vers le muscle ou du muscle vers l'os).

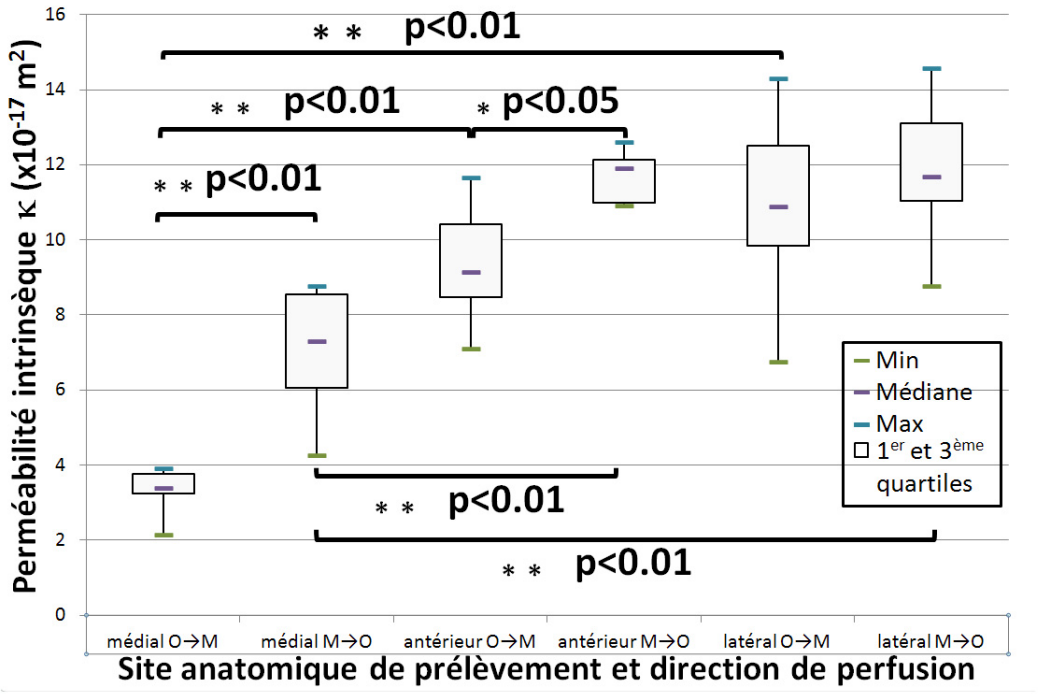



FIGURE 5.3 – Influence du site anatomique de prélèvement des échantillons et de la direction de perfusion sur la perméabilité intrinsèque du périoste fémoral ovin. L'ensemble des tests a été réalisé avec du PBS. O→M : écoulement du fluide de l'os vers de muscle, M→O : écoulement du fluide du muscle vers l'os.

On peut alors observer que, pour une vitesse de moyenne d'écoulement $\left\|\overrightarrow{V_{in}}\right\|$ de $5 \times 10^{-5}$ m.s$^{-1}$ (correspondant au débit élevé utilisé par Evans et al. [69] lors d'une étude antérieure), le site de prélèvement a une influence statistiquement significative sur la valeur moyenne de la perméabilité des échantillons et sur la dépendance de cette dernière vis-à-vis de la direction de perfusion. En effet, si les prélèvements issus des faces antérieure et latérale présentent des perméabilités intrinsèques moyennes similaires ($\kappa \sim 1.2 \times 10^{-16}$ m$^2$), ceux issus de la face médiale possèdent une perméabilité intrinsèque plus faible ($\kappa \in [0.2, 0.8] \times 10^{-16}$ m$^2$, $p < 0.01$). De plus, si la dépendance de $\kappa$ vis-à-vis de la direction du flux de fluide est bien visible pour les prélèvements médiaux et antérieurs, les échantillons latéraux semblent eux avoir le même comportement quel que soit le sens de perfusion.

### 5.2.2 Influence du niveau de concentration de la solution perfusante

Nous avons dans un deuxième temps fait varier la concentration en chlorure de sodium de la solution utilisée pour perfuser les échantillons, ces derniers provenant cette fois tous de la face

antérieure des fémurs utilisés. Les estimations de la perméabilité intrinsèque $\kappa$ correspondant à ces tests sont présentées sur la figure 5.4

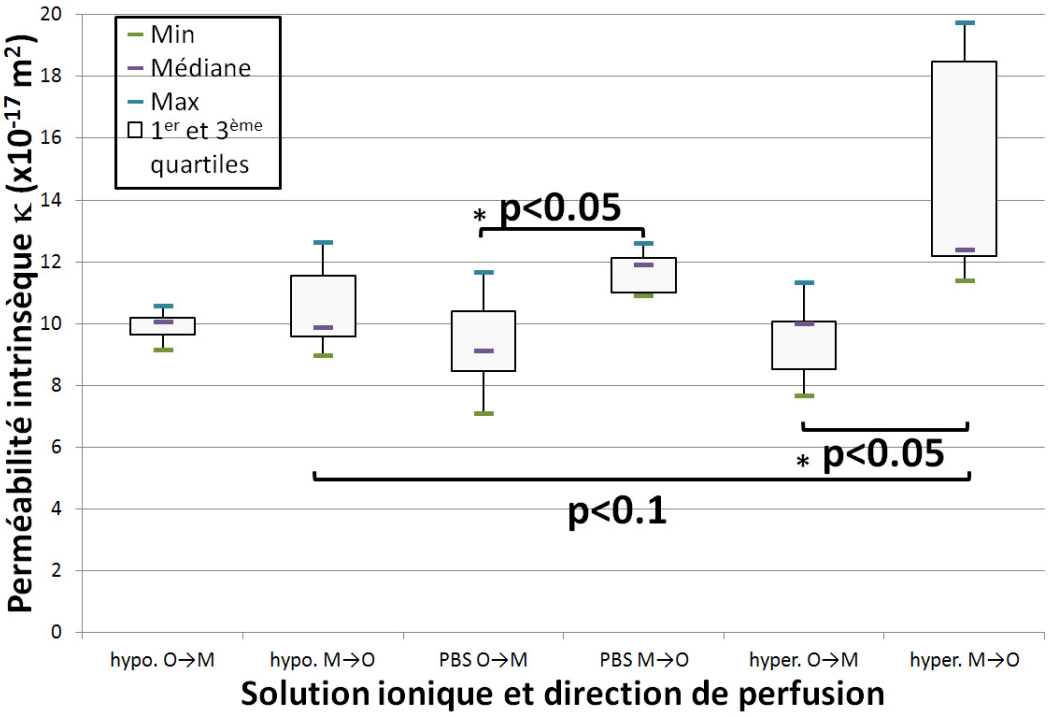



FIGURE 5.4 – Influence de la direction et de la salinité de la solution de perfusion sur la perméabilité intrinsèque du périoste fémoral ovin. L'ensemble des tests a été réalisé avec des échantillons prélevés sur la face antérieure des fémurs.

On peut alors remarquer que, pour les tests réalisés avec la solution hypotonique, la perméabilité mesurée ne dépend pas du sens de perfusion du fluide. En revanche, au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium de la solution perfusante, la perméabilité du périoste augmente dans la direction $muscle \rightarrow os$, alors qu'elle reste stable dans la direction $os \rightarrow muscle$. Le comportement directionnel de cette membrane disparaît donc lors de l'emploi de solutions faiblement concentrées.

## 5.3 Discussion

Pour tenter d'analyser ces résultats, il faut revenir à la structure du périoste (voir figure 5.5). Ce dernier se compose de deux couches : la plus proche de l'os, appelée *cambium*, est constituée de cellules liées par des jonctions serrées ("tight junctions") ; la deuxième, située du côté des muscles

environnants, est une couche fibreuse majoritairement composée de fibres de collagène et d'élastine, qui confèrent ses propriétés mécaniques au périoste [6]. Elles constituent deux réseaux poreux placés en série lors de la perfusion des échantillons.

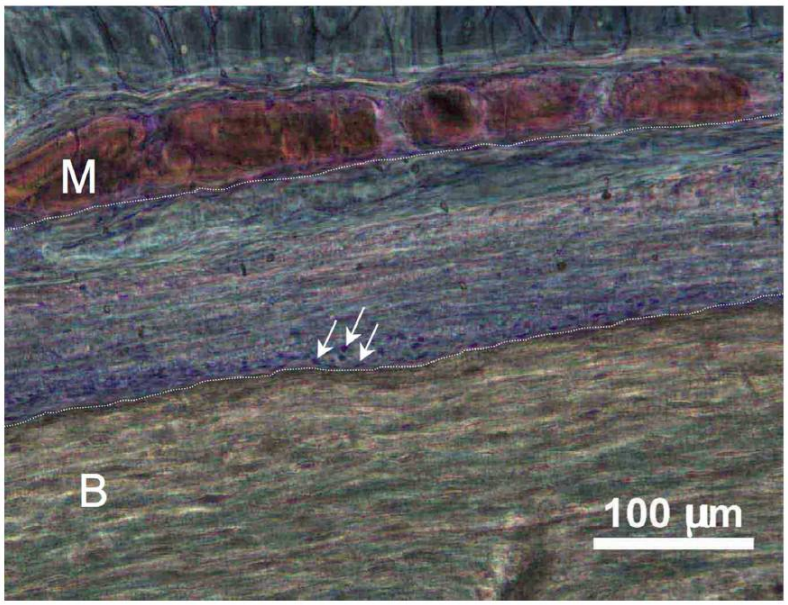



FIGURE 5.5 – Section transverse du périoste et de ses tissus environnants (B : os, M : muscle) d'un site antérieur de la diaphyse d'un fémur ovin. Echantillon décalcifié et coloré au Giemsa (azur de méthylène et éosine). Les lignes en pointillé délimitent le périoste, et les flèches blanches désignent des cellules appartenant à la couche cellulaire du périoste. Images issue de Evans et al. [69].

La suite de ce chapitre propose un ensemble d'hypothèses explicatives concernant le rôle joué par chacune de ces couches sur le comportement particulier du périoste. Ces dernières devront être vérifiées par la réalisation future d'études expérimentales complémentaires.

### 5.3.1 Influence de la couche fibreuse

Les fibres composant la couche externe du périoste possédant une densité surfacique de charge non nulle [179], des interactions électro-osmotiques peuvent avoir lieu lors du passage d'une solution ionique telle que celles utilisées lors des tests expérimentaux. De plus, en raison de leur nature piézoélectrique, la polarisation des fibres de collagène varie avec leur état de déformation (voir figure 5.6) : *in situ*, les zones en tension – proches de l'interface périoste/muscles – sont ainsi chargées positivement, alors que les zones en compression – proches de l'interface périoste/os – présentent une charge négative [185].

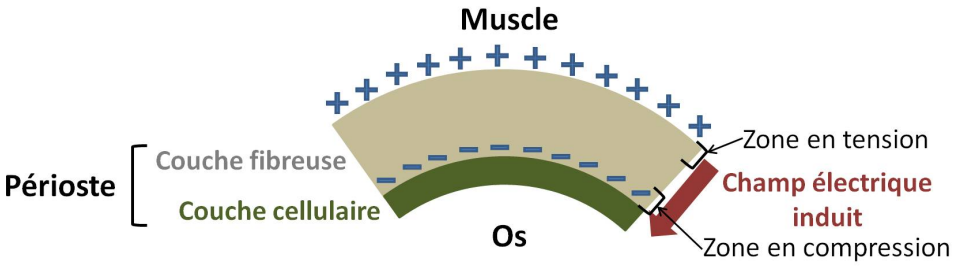



FIGURE 5.6 – Possibles interactions électriques dues à la nature piézoélectrique des fibres de collagène aux sein de la couche fibreuse du périoste *in situ*. Les zones situées sur la face externe de ce dernier, en tension, sont chargées positivement, alors que celles situées près du tissu osseux, en compression, sont chargées négativement. Il apparaît alors un champ électrique macroscopique, susceptible d'influencer le transport des ions.

Dans ces conditions, il apparaît un champ électrique macroscopique unidirectionnel (voir figure 5.6) qui faciliterait le passage des cations dans la direction $muscle \rightarrow os$ (phénomène de permsélectivité [216]), et ce d'autant plus que la courbure locale, et donc la déformation des fibres de collagène, est importante (sur la face antérieure du fémur en particulier). Ceci est en accord avec les observations rapportées dans les travaux de Knothe Tate [129], qui font état d'une concentration en cations (et notamment en ions potassium) plus importante dans le fluide interstitiel osseux que dans le plasma sanguin.

Remarque : Même si la courbure naturelle des échantillons n'est pas préservée lors de leur prélèvement, il est probable que le taux de déformation des fibres situées sur la face externe de ces derniers (du côté "muscle") diffère de celui des fibres situées sur leur face interne (du côté "os"), d'où la présence d'un champ électrique macroscopique mesurable expérimentalement (voir annexe E).

De plus, l'orientation des fibres de collagène au sein du périoste diffère d'un site anatomique à l'autre [75], de même que les sollicitations mécaniques macroscopiques subies par l'ensemble os-périoste [25]. L'état de précontrainte du périoste, et donc le taux de déformation des fibres qui le composent, varie ainsi entre deux sites de prélèvement, ce qui modifie les interactions électro-osmotiques locales. Or, il a été montré que les propriétés de transport du périoste dépendent fortement de ce paramètre [69].

Néanmoins, les perméabilités relevées sont de l'ordre de $10^{-17}$ à $10^{-16}$ m$^2$ ce qui, en se référant à l'équation (2.12) reliant la perméabilité intrinsèque d'un milieu poreux aux caractéristiques géométriques de ses pores, correspond à une taille de pores de l'ordre de $10^{-8}$ m. La distance moyenne

entre deux fibres de collagène, de l'ordre de $1$ à $10$ $\mu$m [250, 92], est donc *a priori* trop importante pour que les pores de la couche fibreuse puissent être à l'origine des valeurs expérimentales obtenues. En revanche, ce niveau de perméabilité correspond à des pores de taille similaire à celle des jonctions cellulaires serrées (*"tight junctions"*) qui relient les cellules composant la couche interne du périoste (*i.e.* du côté de l'os) [10]. Celles-ci pourraient donc jouer un rôle déterminant dans ses propriétés de transport.

### 5.3.2 Influence de la couche cellulaire

Lors de la traversée de pores nanométriques tels que les jonctions cellulaires, le transport de fluide est gouverné par les flux électro-osmotiques (voir graphique 2.5), les ions entraînant les molécules d'eau environnantes par interactions visqueuses. Les cations étant plus hydratés que les anions [146], l'apparition d'un champ électrique dans un réseau de nanopores crée donc un écoulement de fluide macroscopique de la cathode vers l'anode. Dans le cas du périoste, l'influence à distance du champ électrique créé par la couche fibreuse sur les pores cellulaires pourrait donc expliquer une plus forte perméabilité de la couche cellulaire dans la direction $muscle \rightarrow os$, sens de déplacement des cations. De plus, les jonctions cellulaires possèdent une perméabilité ionique sélective en fonction de la taille et de la charge des ions perfusés [61, 10]. En effet, en raison de la nature des protéines qui les composent, ces dernières facilitent le passage des cations de petite taille au détriment des anions et des macromolécules. Cette propriété tend à renforcer l'écart de perméabilité mesuré entre les deux directions de perfusion.

Néanmoins, d'après les travaux de Diecke et al. [61], seul $18\%$ à $58\%$ du transport hydrique s'effectue de façon paracellulaire (*i.e.* au niveau des jonctions cellulaires) lors de la traversée d'une membrane cellulaire épithéliale par un fluide, le reste de ce transport étant réalisé par voie transcellulaire (*i.e.* en traversant la membrane cellulaire) à l'aide de mécanismes de transport actifs. Dans le cadre de notre étude, les échantillons testés étant inertes, seul le premier type de transport est observé. On n'étudie donc ici qu'une partie du comportement hydro-mécanique du périoste qui, *in vivo*, serait vraisemblablement plus complexe..

De plus, si l'action combinée de l'influence des fibres de collagène et des propriétés sélectives des jonctions cellulaires peut être à l'origine de la dépendance de la perméabilité au sens de perfu-

sion, elle peut difficilement expliquer l'influence du site anatomique de prélèvement sur les valeurs moyennes de $\kappa$ relevées.

### 5.3.3 Rôle des fibres de Sharpey

Les fibres de Sharpey sont des fibres de diamètre de l'ordre de $1$ à $50$ $\mu$m, principalement composées de fibres de collagène et d'élastine [1, 5], qui maintiennent le périoste au contact de l'os. Pour cela, elles prennent naissance dans la couche fibreuse du périoste, puis traversent la couche cellulaire pour s'enfoncer dans l'os cortical sous-jacent. Lors du prélèvement des échantillons, ces fibres sont donc sectionnées, et peuvent se rétracter, formant un ensemble de pores micrométriques dans la couche cellulaire. Ce niveau de porosité constitue un réseau poreux absent *in vivo*, parallèle à celui des jonctions cellulaires. Il introduit donc un biais qui peut conduire à surévaluer la perméabilité du périoste.

Or, lors de la réalisation des tests expérimentaux, on peut observer que les échantillons issus de la face médiale des fémurs sont significativement plus minces que ceux issus des faces antérieure et latérale ($0.08$ à $0.1$ mm d'épaisseur en moyenne pour les premiers, contre $0.2$ mm pour les autres). De même, les échantillons médiaux se détachent plus facilement de l'os sous-jacent que ceux issus des deux autres sites de prélèvement. Il se pourrait donc que le réseau de fibres de Sharpey soit moins dense dans cette zone anatomique, ce qui pourrait expliquer la perméabilité moyenne plus faible des échantillons issus de la face médiale. Par ailleurs, les nouveaux pores créés par le retrait des fibres de Sharpey étant micrométriques (et non nanométriques), le transport de fluide en leur sein serait alors majoritairement régi par le gradient hydraulique, et non par la force motrice électro-osmotique (voir chapitre 2). Leur comportement ne serait donc que très peu influencé par le sens de perfusion du fluide. L'apparition de ce nouveau réseau poreux pourrait donc diminuer la sensibilité des échantillons à la direction de perfusion, et être éventuellement à l'origine de la différence de comportement observée entre les échantillons issus, notamment, des faces médiale et latérale.

Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer une étude anatomique, pour évaluer la densité du réseau des fibres de Sharpey et le diamètre de ces dernières dans différentes zones du fémur.

### 5.3.4 Influence de la salinité de la solution perfusante

Enfin, la dépendance du comportement asymétrique du périoste à la salinité de la solution étudiée, observée sur la figure 5.4, conforte l'hypothèse d'un rôle déterminant joué par la couche cellulaire dans les mécanismes de transport hydraulique et chimique à travers le périoste. En effet, à l'échelle d'une jonction cellulaire, les interactions électriques entre les parois du pore (chargées négativement) et les doubles-couches cationiques présentes dans le fluide se traduisent par l'apparition d'une pression de gonflement appelée pression de Donnan. Celle-ci résulte de la répulsion électrostatique apparaissant lorsque la taille des doubles-couches est comparable au rayon du pore, et génère alors une augmentation de ce dernier. Les pores étant élargis, le flux de fluide électro-osmotique deviendrait alors faible en comparaison au flux hydraulique (voir paragraphe 2.3.4), limitant le caractère asymétrique du comportement hydrique des échantillons de périoste.

## 5.4 Conclusion

Les propriétés de transport particulières du périoste résultent vraisemblablement des actions conjuguées de plusieurs phénomènes physico-chimiques, qu'il est difficile d'isoler expérimentalement. Néanmoins, les tests réalisés dans cette étude, associés aux résultats d'études précédemment menées par l'équipe du professeur Knothe Tate, permettent d'identifier différents acteurs, aux rôles distincts. Ainsi, si la couche fibreuse a une influence probable sur le transport du fluide au sein du périoste, il semble que l'ordre de grandeur de la perméabilité de ce dernier soit lié à sa couche cellulaire. De plus, les pores de cette dernière étant nanométriques, la progression du fluide en leur sein est gouvernée par les interactions électro-chimiques locales. Ceci est cohérent avec la diminution du caractère directionnel du comportement des échantillons observée lors des tests réalisés avec une solution hypo-osmotique, et rejoint les conclusions des études effectuées sur le comportement d'autres membranes épithéliales [10, 230].

Pour caractériser de manière plus précise ces interactions (en reliant par exemple les sollicitations mécaniques environnantes au champ électrique créé par la couche fibreuse), il serait intéressant d'étudier l'impact d'un champ électrique extérieur, ou de déformations mécaniques imposées, sur la perméabilité du périoste. Le protocole de prélèvement des échantillons devrait également être amélioré pour préserver la courbure naturelle de ces derniers. En outre, des tests expérimentaux

d'osmose membranaires, présentés dans l'annexe E, semblent indiquer que les structures responsables du comportement directionnel du périoste sont détruites par le processus de congélation.

Par ailleurs, les propriétés de transport du périoste, et notamment sa sensibilité à la direction de perfusion, dépendent du site de prélèvement considéré. L'environnement du périoste pouvant varier d'une zone à l'autre en terme de chargement mécanique (attachement musculaire, etc.) et de conditions biochimiques (différence de vascularisation), sa structure (épaisseur, réseau de fibres de Sharpey, orientation des fibres de collagène) dépend donc logiquement de la zone anatomique étudiée. Il serait donc intéressant de conduire des études expérimentales complémentaires pour caractériser de façon plus précise cette dépendance.

# Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse constitue la première étape d'un projet de développement de supports et de protocoles de réparation osseuse destinés à la prise en charge des fractures osseuses de grande taille. L'objectif de cette étude était donc de dégager des méthodes et des outils permettant d'identifier les paramètres clés dans la réalisation de tels protocoles et, en particulier, le rôle tenu par les mécanismes de transport (cellulaire, hydraulique et chimique).

Pour cela, nous avons choisi d'associer deux approches : la réalisation d'études expérimentales et la mise au point de modèles numériques. Ces derniers nous permettent, sans chercher à reproduire fidèlement le dispositif expérimental, d'améliorer notre compréhension du rôle joué par les différents phénomènes physico-chimiques mis en jeu lors des expériences, et de dégager des pistes de développement futur pour les protocoles étudiés. A l'inverse, appuyer les simulations numériques sur les résultats des tests réalisés permet de s'assurer de rester en accord avec la réalité expérimentale. Ceci est d'autant plus important que, lors de l'étude de systèmes vivants, il est extrêmement difficile d'identifier l'ensemble des paramètres à l'origine des comportements observés.

Après avoir présenté le contexte clinique et scientifique de ce projet dans le premier chapitre de ce document, nous avons ainsi pu, dans le chapitre 2, relier la perméabilité intrinsèque d'un milieu poreux, paramètre déterminant dans l'étude du transport de fluide en son sein, à la structure géométrique de ses pores. Nous avons également pu mettre en évidence l'importance des interactions électrochimiques à la nanoéchelle lors de la progression d'une solution ionique (telle que les fluides physiologiques) à travers le réseau lacuno-canaliculaire du tissu osseux, en raison de sa structure et de sa composition chimique (présence de fibres chargées sur la surface des pores) de ce dernier. Ces outils ont ensuite permis d'analyser, en première approche, les résultats expérimen-

taux parfois surprenant obtenus lors de la réalisation de tests de perméabilité sur des échantillons de périoste fémoral ovin (chapitre 5). Il semble ainsi que le comportement asymétrique de cette membrane soit dû à une action combinée des propriétés sélectives des jonctions communicantes de la couche cellulaire et des interactions électrochimiques entre les fibres de la matrice fibreuse et les ions contenus dans la solution perfusante. La diminution de la directionnalité de la perméabilité observée lors de l'utilisation de solution hypo-osmotiques nous conforte de plus dans l'hypothèse d'un rôle prépondérant joué par les jonctions cellulaires sur l'évolution de ce paramètre.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des phénomènes physico-chimiques régulant les propriétés de transport particulières du périoste, il serait intéressant, dans un premier temps, de déterminer les caractéristiques géométriques précises de cette structure poreuse (distance fibre à fibre, densité du réseau de fibres de Sharpey, densité et taille des jonctions cellulaires), ainsi que leur évolution en fonction du site anatomique étudié, à l'aide de techniques d'imagerie. De plus, la réalisation de nouveaux tests de perméabilité sous l'influence d'un champ électrique extérieur ou de contraintes mécaniques fixées, couplée à ces études anatomiques, pourrait permettre de déterminer l'importance de l'influence de la couche fibreuse sur la perméabilité intrinsèque mesurée. L'emploi de molécules de plus grande taille pourrait également nous renseigner sur le processus de sélection des jonctions serrées de la couche cellulaire.

Les chapitres 3 et 4 de ce document sont eux consacrés au développement d'implants associant un substrat minéral biocompatible et des cellules souches mésenchymateuses, pour favoriser une reconstruction tissulaire en volume de la lésion à traiter. Nous avons ainsi pu mettre en place, dans le chapitre 3, un dispositif expérimental permettant de réaliser de manière reproductible un test d'ensemencement cellulaire, et d'évaluer le nombre, la répartition et le taux de viabilité des cellules greffées sur le support utilisé. En revanche, les résultats de ces tests d'ensemencement suggèrent que la structure poreuse des échantillons commerciaux utilisés constitue un facteur limitant dans l'obtention d'un ensemencement cellulaire homogène des futurs implants. A partir de ces observations, nous avons développé un modèle numérique dans le chapitre 4, pour dégager un ensemble de critères, géométriques ou autres, à respecter dans l'élaboration d'un substitut osseux favorisant un développement tissulaire homogène contrôlé lors des premières étapes de sa culture *in vitro*. Ce modèle constitue une première étape dans la détermination d'un cahier des charges

dédié à la conception de tels substrats. Il devrait être complété en intégrant des phénomènes non pris en compte dans cette première approche, tels que la migration et la mort cellulaires ou les mécanismes régissant la production de matrice extracellulaire (MEC) par exemple. Il serait également intéressant de réaliser des tests d'ensemencement cellulaire sur des échantillons possédant d'autres structures poreuses (pores gyroïdes notamment). Il pourrait dans ce cas être judicieux d'utiliser des supports polymères, plus faciles à façonner que les substituts osseux céramiques, tant pour la structure poreuse que pour la forme générale de l'implant.

Enfin, d'un point de vue plus personnel, ce travail de thèse m'a permis, tout en consolidant mes connaissances dans le domaine de la mécanique et de la simulation numérique, de découvrir le domaine de l'expérimentation biologique, qui m'était inconnu, à travers la mise en place de divers protocoles et des dispositifs associés. J'ai également pu intéragir avec des scientifiques de différentes spécialités, expérimentateurs ou numériciens, ce qui m'a permis de me rendre compte à nouveau de la nécessité d'un environnement pluridisciplinaire lors de l'étude d'un problème biomécanique, pour garder une vision d'ensemble du système considéré.

# Bibliographie


[1] J. E. Aaron. Periosteal Sharpey's fibers : a novel bone matrix regulatory system ? *Frontiers in Endocrinology*, 3, 2012.

[2] J. Adam. A simplified model of wound healing (with particular reference to the critical size defect). *Mathematical and Computer Modelling*, 30(5) :23–32, 1999.

[3] A. Ahn and A. Grodzinsky. Relevance of collagen piezoelectricity to Wolff's law : A critical review. *Medical Engineering and Physics*, 31 :733 – 741, 2009.

[4] L. Ai and K. Vafai. A coupling model for macromolecule transport in a stenosed arterial wall. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 49(9) :1568–1591, 2006.

[5] A. Al-Qtaitat, R. Shore, and J. Aaron. Structural changes in the ageing periosteum using collagen III immuno-staining and chromium labelling as indicators. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 10 :112–123, 2010.

[6] M. R. Allen, J. M. Hock, and D. B. Burr. Periosteum : biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*, 35(5) :1003–1012, 2004.

[7] J. F. Alvarez-Barreto, S. M. Linehan, R. L. Shambaugh, and V. I. Sikavitsas. Flow perfusion improves seeding of tissue engineering scaffolds with different architectures. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(3) :429–442, 2007.

[8] E. Anderson, S. Kaliyamoorthy, J. Alexander, and M. Knothe Tate. Nano microscale models of periosteocytic flow show differences in stresses imparted to cell body and processes. *Annals of Biomedical Engineering*, 33 :52–62, 2005.

[9] E. J. Anderson, S. M. Kreuzer, O. Small, and M. L. K. Tate. Pairing computational and scaled physical models to determine permeability as a measure of cellular communication in micro-and nano-scale pericellular spaces. *Microfluidics and Nanofluidics*, 4(3) :193–204, 2008.

[10] J. M. Anderson. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *Physiology*, 16(3) :126–130, 2001.

[11] P. F. Armstrong, C. T. Brighton, and A. M. Star. Capacitively coupled electrical stimulation of bovine growth plate chondrocytes grown in pellet form. *Journal of Orthopaedic Research*, 6(2) :265–271, 1988.

[12] A. Babb, P. Johansen, M. Strand, H. Tenckhoff, and B. Scribner. Bi-directional permeability of the human peritoneum to middle molecules. In *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association*, volume 10, pages 247–62, 1973.

[13] G. A. Belov, P. V. Lidsky, O. V. Mikitas, D. Egger, K. A. Lukyanov, K. Bienz, and V. I. Agol. Bidirectional increase in permeability of nuclear envelope upon poliovirus infection and accompanying alterations of nuclear pores. *Journal of Virology*, 78(18) :10166–10177, 2004.

[14] M. Benalla, L. Cardoso, and S. Cowin. Analytical basis for the determination of the lacunar–canalicular permeability of bone using cyclic loading. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(6) :767–780, 2012.

[15] T. Beno, Y.-J. Yoon, S. Cowin, and S. Fritton. Estimation of bone permeability using accurate microsctructural measurements. *Journal of Biomechanics*, 39 :2378–2387, 2006.

[16] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey. Bone marrow stromal stem cells : nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19(3) :180–192, 2001.

[17] R. Bielby, E. Jones, and D. McGonagle. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*, 38(1) :S26–S32, 2007.

[18] L. Bocquet and E. Charlaix. Nanofluidics, from bulk to interfaces. *Chemical Society Reviews*, 39 :1073–1095, 2010.

[19] L. F. Bonewald. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116(1) :281–290, 2007.

[20] L. F. Bonewald. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2) : 229–238, 2011.

[21] J. Borrelli, W. D. Prickett, W. M. Ricci, et al. Treatment of nonunions and osseous defects with bone graft and calcium sulfate. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 411 : 245–254, 2003.

[22] E. A. Botchwey, M. A. Dupree, S. R. Pollack, E. M. Levine, and C. T. Laurencin. Tissue engineered bone : Measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67(1) :357–367, 2003.

[23] W. J. Boyle, W. S. Simonet, and D. L. Lacey. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937) :337–342, 2003.

[24] A. Braccini, D. Wendt, C. Jaquiery, M. Jakob, M. Heberer, L. Kenins, A. Wodnar-Filipowicz, R. Quarto, and I. Martin. Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts. *Stem Cells*, 23(8) :1066–1072, 2005.

[25] J. Britton, L. Walsh, and P. Prendergast. Mechanical simulation of muscle loading on the proximal femur : analysis of cemented femoral component migration with and without muscle loading. *Clinical Biomechanics*, 18(7) :637–646, 2003.

[26] S. P. Bruder, N. Jaiswal, N. S. Ricalton, J. D. Mosca, K. H. Kraus, and S. Kadiyala. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 355 :S247–S256, 1998.

[27] C. T. Buckley and K. U. OKelly. Maintaining cell depth viability : on the efficacy of a trimodal scaffold pore architecture and dynamic rotational culturing. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 21(5) :1731–1738, 2010.

[28] J. Buckwalter, M. Glimcher, R. Cooper, and R. Recker. Bone biology. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 77(8) :1276–1289, 1995.

[29] M. J. Buehler and Y. C. Yung. Deformation and failure of protein materials in physiologically extreme conditions and disease. *Nature Materials*, 8(3) :175–188, 2009.

[30] E. M. Bueno, G. Laevsky, and G. A. Barabino. Enhancing cell seeding of scaffolds in tissue engineering through manipulation of hydrodynamic parameters. *Journal of Biotechnology*, 129(3) :516–531, 2007.

[31] E. H. Burger, J. Klein-Nulend, and T. H. Smit. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon - a proposal. *Journal of Biomechanics*, 36(10) : 1453 – 1459, 2003.

[32] D. Burr. Does early PTH treatment compromise bone strength ? The balance between remodeling, porosity, bone mineral, and bone size. *Current Osteoporosis Reports*, 3 :19–24, 2005.

[33] M. Buschmann, A. Grodzinsky, et al. A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. *Journal of Biomechanical Engineering*, 117(2) : 179–192, 1995.

[34] R. Cancedda, P. Giannoni, and M. Mastrogiacomo. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, 28(29) :4240–4250, 2007.

[35] L. Cardoso, S. P. Fritton, G. Gailani, M. Benalla, and S. Cowin. Advances in assessment of bone porosity, permeability and interstitial fluid flow. *Journal of Biomechanics*, 46(2) :253 – 265, 2013.

[36] P. Carman. Fluid flow through granular beds. *Chemical Engineering Research and Design*, 15a :150–167, 1937.

[37] P. Carman. Permeability of saturated sands, soils and clays. *Journal of Agricultural Science*, 29 :262–273, 1939.

[38] P. Causin, R. Sacco, and M. Verri. A multiscale approach in the computational modeling of the biophysical environment in artificial cartilage tissue regeneration. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12(4) :763–780, 2013.

[39] CERAVER. http://www.ceraver.com/.

[40] G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, and J. Middleton. Concise review : mesenchymal stem cells : their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11) :2739–2749, 2007.

[41] M. Charles, T. Barr, C. Clokie, and G. Sándor. Fat embolism following posterior iliac graft harvest for jaw reconstruction : Managing the complications of major surgery. *Journal of the Canadian Dental Association*, 73(1) :67–70, 2007.

[42] G. Cheng, B. B. Youssef, P. Markenscoff, and K. Zygourakis. Cell population dynamics modulate the rates of tissue growth processes. *Biophysical Journal*, 90(3) :713–724, 2006.

[43] E. Childs and N. Collis-George. The permeability of porous materials. *Proceedings of the Royal Society of London - Series A : Mathematical and Physical Sciences*, 201 :392–405, 1950.

[44] M. Cioffi, F. Boschetti, M. T. Raimondi, and G. Dubini. Modeling evaluation of the fluid-dynamic microenvironment in tissue-engineered constructs : A micro-ct based model. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(3) :500–510, 2006.

[45] M. Cioffi, J. Küffer, S. Ströbel, G. Dubini, I. Martin, and D. Wendt. Computational evaluation of oxygen and shear stress distributions in 3D perfusion culture systems : macro-scale and micro-structured models. *Journal of Biomechanics*, 41(14) :2918–2925, 2008.

[46] G. M. Cooper, M. P. Mooney, A. K. Gosain, P. G. Campbell, J. E. Losee, and J. Huard. Testing the "critical-size" in calvarial bone defects : revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). *Plastic and Reconstructive Surgery*, 125(6) :1685–1692, 2010.

[47] R. Coujard and J. Poirier. *Précis d'histologie humaine*. Masson, 1980.

[48] S. Cowin. Bone poroelasticity. *Journal of Biomechanics*, 32(3) :217–238, 1999.

[49] S. Cowin. *Bone mechanics handbook*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2nd edition, 2001.

[50] S. Cowin. Mechanosensation and fluid transport in living bone. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2(3) :256–260, 2002.

[51] S. Cowin, G. Gailani, and M. Benalla. Hierarchical poroelasticity : movement of interstitial fluid between porosity levels in bones. *Philosophical Transactions of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1902) :3401–3444, 2009.

[52] D. Cullinane. The role of osteocytes in bone regulation : mineral homeostasis versus mechanoreception. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2(3) :242–244, 2002.

[53] S. Curtze, M. Dembo, M. Miron, and D. B. Jones. Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells. *Journal of Cell Science*, 117(13) :2721–2729, 2004.

[54] L. da Silva Meirelles, P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(11) :2204–2213, 2006.

[55] H. Darcy. *Les fontaines publiques de la ville de Dijon.* Victor Dalmont, 1856.

[56] R. Das, G. van Osch, M. Kreukniet, J. Oostra, H. Weinans, and H. Jahr. Effects of individual control of pH and hypoxia in chondrocyte culture. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(4) : 537–545, 2010.

[57] B. David. *Mise en place et validation d'un modèle in vitro pour l'étude des propriétés mécaniques, diffusives et métaboliques d'un Foie bioartificiel à lit fluidisé.* PhD thesis, Université de Technologie de Compiègne, 2002.

[58] A. Delesse. *Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches*. F. Savy, 1866.

[59] D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 22(1) :87–96, 2000.

[60] J. G. Dellinger, J. Cesarano, and R. D. Jamison. Robotic deposition of model hydroxyapatite scaffolds with multiple architectures and multiscale porosity for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82A(2) :383–394, 2007.

[61] F. P. Diecke, V. I. Cacace, N. Montalbetti, L. Ma, K. Kuang, P. Iserovich, and J. Fischbarg. Comparative permeabilities of the paracellular and transcellular pathways of corneal endothelial layers. *Journal of Membrane Biology*, 242(1) :41–51, 2011.

[62] K. Dolowy. Bioelectrochemistry of cell surfaces. *Progress in Surface Science*, 15(3) :245–368, 1984.

[63] F. Dos Santos, P. Z. Andrade, J. S. Boura, M. M. Abecasis, C. L. Da Silva, and J. Cabral. *Ex vivo* expansion of human mesenchymal stem cells : a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *Journal of Cellular Physiology*, 223(1) :27–35, 2010.

[64] I. Drosse, E. Volkmer, R. Capanna, P. D. Biase, W. Mutschler, and M. Schieker. Tissue engineering for bone defect healing : an update on a multi-component approach. *Injury*, 39 :S9–S20, 2008.

[65] P. Ducy, T. Schinke, and G. Karsenty. The osteoblast : a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289(5484) :1501–1504, 2000.

[66] F. Dullien. *Porous Media : Fluid Transport and Pore Structure*. Academic Press, New-York, 1979.

[67] J.-L. Dulong and C. Legallais. What are the relevant parameters for the geometrical optimization of an implantable bioartificial pancreas ? *Journal of Biomechanical Engineering*, 127(7) :1054–1061, 2005.

[68] European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Opinion on the state of the art concerning tissue engineering. *report # Doc.SANCO/SCMPMD/2001/0006 Final*, 2001.

[69] S. F. Evans, J. B. Parent, C. E. Lasko, X. Zhen, U. R. Knothe, T. Lemaire, and M. L. Knothe Tate. Periosteum, bone's "smart" bounding membrane, exhibits direction-dependent permeability. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(3) :608–617, 2013.

[70] V. Everts, J. Delaisse, W. Korper, D. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, and W. Beertsen. The bone lining cell : its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(1) :77–90, 2002.

[71] C. Fehrer, R. Brunauer, G. Laschober, H. Unterluggauer, S. Reitinger, F. Kloss, C. Gülly, R. Gaßner, and G. Lepperdinger. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, 6(6) :745–757, 2007.

[72] M. Ferretti, M. Muglia, F. Remaggi, V. Cane, and C. Palumbo. Histomorphometric study on the osteocyte lacuno-canalicular network in animals of different species. II. Parallel-fibered and lamellar bones. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 104(3) :121–131, 1999.

[73] J. A. Fishman, M. A. Greenwald, and P. A. Grossi. Transmission of infection with human allografts : essential considerations in donor screening. *Clinical Infectious Diseases*, 55(5) : 720–727, 2012.

[74] B. Flamans, J. Pauchot, H. Petite, N. Blanchet, S. Rochet, P. Garbuio, Y. Tropet, and L. Obert. Pertes de substance osseuse à la main et au poignet traitées en urgence par technique de la membrane induite (technique de masquelet). *Chirurgie de la main*, 29(5) : 307–314, 2010.

[75] J. Foolen, C. van Donkelaar, N. Nowlan, P. Murphy, R. Huiskes, and K. Ito. Collagen orientation in periosteum and perichondrium is aligned with preferential directions of tissue growth. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(9) :1263–1268, 2008.

[76] P. Fornells, J. M. García-Aznar, and M. Doblaré. A finite element dual porosity approach to model deformation-induced fluid flow in cortical bone. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(10) :1687–1698, 2007.

[77] E. H. Frank and A. J. Grodzinsky. Cartilage electromechanics I. Electrokinetic transduction and the effects of electrolyte pH and ionic strength. *Journal of Biomechanics*, 20(6) :615 – 627, 1987.

[78] E. H. Frank and A. J. Grodzinsky. Cartilage electromechanics II. A continuum model of cartilage electrokinetics and correlation with experiments. *Journal of Biomechanics*, 20(6) : 629 – 639, 1987.

[79] A. Freemont. (I) Bone. *Current Orthopaedics*, 12(3) :181–192, 1998.

[80] J. Frenkel. On the theory of seismic and seismoelectric phenomena in a moist soil. *Journal of Physics*, 8 :230–241, 1944.

[81] A. Fritsche, F. Luethen, U. Lembke, B. Finke, C. Zietz, J. Rychly, W. Mittelmeier, and R. Bader. Measuring bone cell adhesion on implant surfaces using a spinning disc device. Bestimmung der Zelladhäsion von Knochenzellen auf Implantatoberflächen mit einer "spinning-disc" Prüfvorrichtung. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 41(2) :83–88, 2010.

[82] S. Fritton and S. Weinbaum. Fluid and solute transport in bone : Flow-induced mechanotransduction. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 41 :347–374, 2009.

[83] H. Frost. Measurement of osteocytes per unit volume and volume components of osteocytes and canaliculae in man. *Henry Ford Hospital Medical Bulletin*, 8 :208–211, 1960.

[84] G. Gailani and S. Cowin. Ramp loading in russian doll poroelasticity. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 59(1) :103–120, 2011.

[85] G. Gailani, M. Benalla, R. Mahamud, S. Cowin, and L. Cardoso. Experimental determination of the permeability in the lacunar-canalicular porosity of bone. *Journal of Biomechanical Engineering*, 131(10) :101007, 2009.

[86] N. D. Gallant, K. E. Michael, and A. J. García. Cell adhesion strengthening : contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 16(9) :4329–4340, 2005.

[87] M. Galli and M. Oyen. Fast identification of poroelastic parameters from indentation tests. *Computer Modeling in Engineering and Sciences*, 48 :241–269, 2009.

[88] J. Gardinier, C. Townend, K.-P. Jen, Q. Wu, R. Duncan, and L. Wang. *In situ* permeability measurement of the mammalian lacunar-canalicular system. *Bone*, 46 :1075–1081, 2010.

[89] T. N. Gardner and S. Mishra. The biomechanical environment of a bone fracture and its influence upon the morphology of healing. *Medical Engineering & Physics*, 25(6) :455–464, 2003.

[90] C. V. Gemmiti and R. E. Guldberg. Fluid flow increases type II collagen deposition and tensile mechanical properties in bioreactor-grown tissue-engineered cartilage. *Tissue Engineering*, 12(3) :469–479, 2006.

[91] L. Geris, P. Van Liedekerke, B. Smeets, E. Tijskens, and H. Ramon. A cell based modelling framework for skeletal tissue engineering applications. *Journal of Biomechanics*, 43(5) : 887–892, 2010.

[92] B. M. Gillette, J. A. Jensen, M. Wang, J. Tchao, and S. K. Sia. Dynamic hydrogels : Switching of 3d microenvironments using two-component naturally derived extracellular matrices. *Advanced Materials*, 22(6) :686–691, 2010.

[93] J. Gosling. *Introductory Statistics*. Quicksmart University Guides Series. Pascal Press, 1995.

[94] G. Goulet, D. Coombe, R. Martinuzzi, and R. Zernicke. Poroelastic evaluation of fluid movement through the lacunocanalicular system. *Annals of Biomedical Engineering*, 37 (7) :1390–1402, 2009.

[95] A. S. Greenwald, S. D. Boden, V. M. Goldberg, Y. Khan, C. T. Laurencin, and R. N. Rosier. Bone-graft substitutes : facts, fictions, and applications. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 83(2 suppl 2) :S98–103, 2001.

[96] D. J. Griffon, J. P. Abulencia, G. R. Ragetly, L. P. Fredericks, and S. Chaieb. A comparative study of seeding techniques and three-dimensional matrices for mesenchymal cell attachment. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(3) :169–179, 2011.

[97] M. Grimshaw and R. Mason. Bovine articular chondrocyte function *in vitro* depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(5) :386 – 392, 2000.

[98] G. Gu, K. Kurata, Z. Chen, and K. H. Väänänen. Osteocyte : a cellular basis for mechanotransduction in bone. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2(4) :150–165, 2007.

[99] Z. Gugala, R. W. Lindsey, and S. Gogolewski. New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones. In *Macromolecular Symposia*, volume 253, pages 147–161, 2007.

[100] S. Gururaja, H. Kim, C. Swan, R. Brand, and R. Lakes. Modeling deformation-induced fluid flow in cortical bone's canalicular-lacunar system. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(1) :7–25, 2005.

[101] N. Guzelsu and W. Walsh. Streaming potential of intact wet bone. *Journal of Biomechanics*, 23(7) :673–685, 1990.

[102] D. J. Hadjidakis and I. I. Androulakis. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1) :385–396, 2006.

[103] R. Hambli and R. Rieger. Physiologically based mathematical model of transduction of mechanobiological signals by osteocytes. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(1-2) :83–93, 2012.

[104] K. E. Hammerick, M. T. Longaker, and F. B. Prinz. *In vitro* effects of direct current electric fields on adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(1) :12–17, 2010.

[105] Y. Han, S. Cowin, M. B. Schaffler, and S. Weinbaum. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47) :16689–16694, 2004.

[106] I. Harding, N. Rashid, and K. Hing. Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface. *Biomaterials*, 26(34) :6818–6826, 2005.

[107] M. Hartig, U. Joos, and H.-P. Wiesmann. Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation *in vitro*. *European Biophysics Journal*, 29(7) :499–506, 2000.

[108] J. Hollinger and M. E. Wong. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 82(6) :594–606, 1996.

[109] J. O. Hollinger and J. C. Kleinschmidt. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery*, 1(1) :60–68, 1990.

[110] H. L. Holtorf, T. L. Sheffield, C. G. Ambrose, J. A. Jansen, and A. G. Mikos. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(9) :1238–1248, 2005.

[111] B. E. Houser, J. T. Mellonig, M. A. Brunsvold, D. L. Cochran, R. M. Meffert, and M. E. Alder. Clinical evaluation of anorganic bovine bone xenograft with a bioabsorbable collagen barrier in the treatment of molar furcation defects. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 21(2) :161, 2001.

[112] R. Hunter. *Zeta Potential in Colloid Science : Principles and Applications.* Academic Press, 1981.

[113] A. S. Iberall. Permeability of glass wool and other highly porous media. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 45(5) :398–406, 1950.

[114] D. I. Ilan and A. L. Ladd. Bone graft substitutes. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*, 9(4) :151–160, 2002.

[115] G. A. Ilizarov. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues : Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 239 :263–285, 1989.

[116] N. K. Inamdar, L. G. Griffith, and J. T. Borenstein. Transport and shear in a microfluidic membrane bilayer device for cell culture. *Biomicrofluidics*, 5 :022213, 2011.

[117] J. Jagur-Grodzinski. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. concise general review of recent studies. *Polymers for Advanced Technologies*, 17(6) :395–418, 2006.

[118] A. Jaklenec, A. Stamp, E. Deweerd, A. Sherwin, and R. Langer. Progress in the tissue engineering and stem cell industry. "Are we there yet ?". *Tissue Engineering Part B : Reviews*, 18(3) :155–166, 2012.

[119] P. Janicki and G. Schmidmaier. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute ? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, 42(Suppl 2) : S77–S81, 2011.

[120] J. Kaiser, T. Lemaire, S. Naili, S. Komarova, and V. Sansalone. Calcium fluxes within cortical bone fluid may affect osteocyte mechanosensitivity. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 14(Suppl 1) :S141–142, 2011.

[121] Y. Kameo, T. Adachi, N. Sato, and M. Hojo. Estimation of bone permeability considering the morphology of lacuno-canalicular porosity. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 3(3) :240–248, 2010.

[122] V. Karageorgiou and D. Kaplan. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27) :5474 – 5491, 2005.

[123] C. Kasper, M. van Griensven, and R. Pörtner. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering II*. Springer, 2010.

[124] P. Kasten, I. Beyen, P. Niemeyer, R. Luginbühl, M. Bohner, and W. Richter. Porosity and pore size of ß-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells : An *in vitro* and *in vivo* study. *Acta Biomaterialia*, 4(6) :1904 – 1915, 2008.

[125] M. Khakpour and K. Vafai. Critical assessment of arterial transport models. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 51(3) :807–822, 2008.

[126] T. Kitagawa, T. Yamaoka, R. Iwase, and A. Murakami. Three-dimensional cell seeding and growth in radial-flow perfusion bioreactor for *in vitro* tissue reconstruction. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5) :947–954, 2006.

[127] U. R. Knothe and D. S. Springfield. A novel surgical procedure for bridging of massive bone defects. *World Journal of Surgical Oncology*, 3(1) :7, 2005.

[128] U. R. Knothe, S. Dolejs, R. Matthew Miller, and M. L. Knothe Tate. Effects of mechanical loading patterns, bone graft, and proximity to periosteum on bone defect healing. *Journal of Biomechanics*, 43(14) :2728–2737, 2010.

[129] M. L. Knothe Tate. "Whither flows the fluid in bone ?" An osteocyte's perspective. *Journal of Biomechanics*, 36(10) :1409 – 1424, 2003.

[130] M. L. Knothe Tate, P. Niederer, and U. Knothe. *In vivo* tracer transport through the lacuno-canalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone*, 22 (2) :107–117, 1998.

[131] M. L. Knothe Tate, J. R. Adamson, A. E. Tami, and T. W. Bauer. The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(1) :1–8, 2004.

[132] M. L. Knothe Tate, T. F. Ritzman, E. Schneider, and U. R. Knothe. Testing of a new one-stage bone-transport surgical procedure exploiting the periosteum for the repair of long-bone defects. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 89(2) :307–316, 2007.

[133] M. L. Knothe Tate, R. Steck, and E. J. Anderson. Bone as an inspiration for a novel class of mechanoactive materials. *Biomaterials*, 30(2) :133–140, 2009.

[134] M. L. Knothe Tate, T. Falls, S. Mishra, and R. Atit. Engineering an ecosystem : taking cues from nature's paradigm to build tissue in the lab and the body. *New Perspectives in Mathematical Biology*, 57 :113, 2010.

[135] M. L. Knothe Tate, H. Chang, S. R. Moore, and U. R. Knothe. Surgical membranes as directional delivery devices to generate tissue : testing in an ovine critical sized defect model. *PloS one*, 6(12) :e28702, 2011.

[136] M. Koch, E. Vrij, E. Engel, J. Planell, and D. Lacroix. Perfusion cell seeding on large porous PLA/calcium phosphate composite scaffolds in a perfusion bioreactor system under varying perfusion parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(4) :1011–1018, 2010.

[137] S. V. Komarova, F. I. Ataullakhanov, and R. K. Globus. Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(4) :C1220–C1229, 2000.

[138] M. Kozeny. Über Kapillare Leitung des Wassers im Boden. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien*, 136 :Abt. II a, P. 277, 1927.

[139] A. Krinner, M. Zscharnack, A. Bader, D. Drasdo, and J. Galle. Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation. *Cell Proliferation*, 42(4) :471–484, 2009.

[140] S. J. Krizan. *The Role of Adhesion Strength in Human Mesenchymal Stem Cell Osteoblastic Differentiation on Biodegradable Polymers*. ProQuest, 2009.

[141] W. Lai, W. Gu, and V. Mow. On the conditional equivalence of chemical loading and mechanical loading on articular cartilage. *Journal of Biomechanics*, 31(12) :1181 – 1185, 1998.

[142] R. Lanza, R. Langer, and J. P. Vacanti. *Principles of tissue engineering (2nd edition)*. Academic press, 2000.

[143] E. Leclerc, B. David, L. Griscom, B. Lepioufle, T. Fujii, P. Layrolle, and C. Legallaisa. Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment. *Biomaterials*, 27(4) :586–595, 2006.

[144] T. Lemaire, C. Moyne, and D. Stemmelen. Imbibition test in a clay powder (MX-80 bentonite). *Applied Clay Science*, 26(1-4) :235–248, 2004.

[145] T. Lemaire, S. Naili, and A. Rémond. Multi-scale analysis of the coupled effects governing the movement of interstitial fluid in cortical bone. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 5(1) :39–52, 2006.

[146] T. Lemaire, C. Moyne, and D. Stemmelen. Modelling of electro-osmosis in clayey materials including pH effects. *Physics and Chemistry of the Earth A/B/C*, 32(1-7) :441–452, 2007.

[147] T. Lemaire, F. Borocin, and S. Naili. Mechanotransduction of bone remodelling : role of micro-cracks at the periphery of osteons. *C.R. Mecanique*, 336 :354–362, 2008.

[148] T. Lemaire, S. Naili, and A. Rémond. Study of the influence of fibrous pericellular matrix in the cortical interstitial fluid movement with hydroelectrochemical effects. *Journal of Biomechanical Engineering*, 130(1) :011001, 2008.

[149] T. Lemaire, V. Sansalone, and S. Naili. Multiphysical modelling of fluid transport through osteo-articular media. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(1) :127–144, 2010.

[150] T. Lemaire, E. Capiez-Lernout, J. Kaiser, S. Naili, E. Rohan, and V. Sansalone. A multiscale theoretical investigation of electric measurements in living bone. piezo-electricity and electrokinetics. *Bulletin of Mathematical Biology*, 73(11) :2649–2677, 2011.

[151] T. Lemaire, E. Capiez-Lernout, J. Kaiser, S. Naili, and V. Sansalone. What is the importance of multiphysical phenomena in bone remodelling signals expression ? A multiscale perspective. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(6) :909–920, 2011.

[152] T. Lemaire, S. Lemonnier, and S. Naili. On the paradoxical determinations of the lacuno-canalicular permeability of bone. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(7) : 933–946, 2012.

[153] T. Lemaire, J. Kaiser, S. Naili, and V. Sansalone. Textural versus electrostatic exclusion-enrichment effects in the effective chemical transport within the cortical bone : A numerical investigation. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, 29 (11) :1223–1242, 2013.

[154] G. Li, J. T. Bronk, K.-N. An, and P. J. Kelly. Permeability of cortical bone of canine tibiae. *Microvascular Research*, 34(3) :302–310, 1987.

[155] H. Li, J. R. Friend, and L. Y. Yeo. A scaffold cell seeding method driven by surface acoustic waves. *Biomaterials*, 28(28) :4098–4104, 2007.

[156] M. A. Liebschner and T. S. Keller. Hydraulic strengthening affects the stiffness and strength of cortical bone. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(1) :26–38, 2005.

[157] Y. Lin and S. Xu. AFM analysis of the lacunar-canalicular network in demineralized compact bone. *Journal of Microscopy*, 241(3) :291–302, 2011.

[158] J. Lobry, J. Flandrois, G. Carret, and A. Pave. Monod's bacterial growth model revisited. *Bulletin of Mathematical Biology*, 54(1) :117–122, 1992.

[159] P. Low. The clay/water interface and its role in the environment. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 95 :98–107, 1994.

[160] E. Mackie. Osteoblasts : novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(9) :1301–1305, 2003.

[161] L. Maini, M. Chadha, J. Vishwanath, S. Kapoor, A. Mehtani, and B. Dhaon. The Ilizarov method in infected nonunion of fractures. *Injury*, 31(7) :509–517, 2000.

[162] A. F. Mak, D. Huang, J. Zhang, and P. Tong. Deformation-induced hierarchical flows and drag forces in bone canaliculi and matrix microporosity. *Journal of Biomechanics*, 30(1) : 11–18, 1997.

[163] E. Malachanne, D. Dureisseix, and F. Jourdan. Numerical model of bone remodeling sensitive to loading frequency through a poroelastic behavior and internal fluid movements. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(6) :849–857, 2011.

[164] J. Malda, J. Rouwkema, D. E. Martens, E. P. le Comte, F. Kooy, J. Tramper, C. A. van Blitterswijk, and J. Riesle. Oxygen gradients in tissue-engineered PEGT/PBT cartilaginous constructs : Measurement and modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(1) :9–18, 2004.

[165] L. Mancuso, M. Liuzzo, S. Fadda, M. Pisu, A. Cincotti, M. Arras, E. Desogus, F. Piras, G. Piga, G. La Nasa, et al. Experimental analysis and modelling of *in vitro* proliferation of mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 42(5) :602–616, 2009.

[166] L. Mancuso, M. Ilaria Liuzzo, S. Fadda, A. Cincotti, M. Pisu, A. Concas, and G. Cao. Experimental analysis and modeling of bone marrow mesenchymal stem cells proliferation. *Chemical Engineering Science*, 65(1) :562–568, 2010.

[167] H. J. Mankin, F. J. Hornicek, and K. A. Raskin. Infection in massive bone allografts. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 432 :210–216, 2005.

[168] P. Marie. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/Sciences*, 17(12) : 1252–1259, 2001.

[169] G. Marotti, M. Ferretti, M. Muglia, C. Palumbo, and S. Palazzini. A quantitative evaluation of osteoblast-osteocyte relationships on growing endosteal surface of rabbit tibiae. *Bone*, 13 (5) :363–368, 1992.

[170] R. Marsell and T. A. Einhorn. The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6) :551–555, 2011.

[171] C. Martin, B. Riou, and B. Vallet. *Physiologie humaine appliquée*. Arnette, 2006.

[172] R. Martin. Is all cortical bone remodeling initiated by microdamage ? *Bone*, 30(1) :8–13, 2002.

[173] A. Masquelet and L. Obert. La technique de la membrane induite pour les pertes de substance osseuse de la main et du poignet. *Chirurgie de la Main*, 29(Suppl 1) :S221–S224, 2010.

[174] T. Matsumoto, R. Kuroda, Y. Mifune, A. Kawamoto, T. Shoji, M. Miwa, T. Asahara, and M. Kurosaka. Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone*, 43(3) :434–439, 2008.

[175] K. J. Mattern, C. Nakornchai, and W. M. Deen. Darcy permeability of agarose-glycosaminoglycan gels analyzed using fiber-mixture and donnan models. *Biophysical Journal*, 95(2) :648–656, 2008.

[176] A.-C. Maurin, R. Fromental, D. Cantaloube, and R. Caterini. Étude de la colonisation par des ostéoblastes humains de métaux poreux à base de nitinol ou de tantale dans un modèle de culture cellulaire tridimensionnelle. *Implantodontie*, 14(2) :44–50, 2005.

[177] G. Mavko, T. Mukerji, and J. Dvorkin. *The Rock Physics Handbook*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2nd edition, 2009.

[178] S. Maxson, D. Orr, and K. J. Burg. Bioreactors for tissue engineering. In *Tissue engineering*, pages 179–197. Springer, 2011.

[179] J.-M. Mbuyi-Muamba, J. Dequeker, and G. Gevers. Biochemistry of bone. *Baillière's Clinical Rheumatology*, 2(1) :63–101, 1988.

[180] J. A. McAuliffe. Bone graft substitutes. *Journal of Hand Therapy*, 16(2) :180–187, 2003.

[181] S. H. McBride, T. Falls, and M. L. Knothe Tate. Modulation of stem cell shape and fate B : mechanical modulation of cell shape and gene expression. *Tissue Engineering Part A*, 14 (9) :1573–1580, 2008.

[182] S. H. McBride, S. Dolejs, S. Brianza, U. Knothe, and M. L. Knothe Tate. Net change in periosteal strain during stance shift loading after surgery correlates to rapid *de novo* bone generation in critically sized defects. *Annals of Biomedical Engineering*, 39(5) :1570–1581, 2011.

[183] S. H. McBride, S. F. Evans, and M. L. Knothe Tate. Anisotropic mechanical properties of ovine femoral periosteum and the effects of cryopreservation. *Journal of Biomechanics*, 44 (10) :1954–1959, 2011.

[184] R. J. McCoy, C. Jungreuthmayer, and F. J. O'Brien. Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6) :1583–1594, 2012.

[185] J. H. McElhaney. The charge distribution on the human femur due to load. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 49(8) :1561–1571, 1967.

[186] F. P. Melchels, A. Barradas, C. A. Van Blitterswijk, J. De Boer, J. Feijen, and D. W. Grijpma. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. *Acta Biomaterialia*, 6(11) :4208–4217, 2010.

[187] J. T. Mellonig. Human histologic evaluation of a bovine-derived bone xenograft in the treatment of periodontal osseous defects. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 20(1) :19, 2000.

[188] S. Meng, Z. Zhang, and M. Rouabhia. Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 29 (5) :535–544, 2011.

[189] U. Meyer, U. Joos, and H. Wiesmann. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering : part i. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 33(4) :325–332, 2004.

[190] L. Michaelis and M. L. Menten. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49(352) :333–369, 1913.

[191] C. Moyne and M. Murad. Electro-chemo-mechanical couplings in swelling clays derived from a micro/macro-homogenization procedure. *International Journal of Solids and Structures*, 39(25) :6159–6190, 2002.

[192] K. Muramatsu, K. Doi, K. Ihara, M. Shigetomi, and S. Kawai. Recalcitrant posttraumatic nonunion of the humerus : 23 patients reconstructed with vascularized bone graft. *Acta Orthopaedica*, 74(1) :95–97, 2003.

[193] G. Myers, A. Abudu, S. Carter, R. Tillman, and R. Grimer. Endoprosthetic replacement of the distal femur for bone tumours long-term results. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 89(4) :521–526, 2007.

[194] S. Nandi, S. Roy, P. Mukherjee, B. Kundu, D. De, and D. Basu. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes : a review. *Indian Journal of Medical Research*, 132 :15–30, 2010.

[195] S. Nathan, S. D. De, A. Thambyah, C. Fen, J. Goh, and E. H. Lee. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects : a novel use for adipose tissue. *Tissue Engineering*, 9(4) : 733–744, 2003.

[196] M. M. Nava, M. T. Raimondi, and R. Pietrabissa. A multiphysics 3D model of tissue growth under interstitial perfusion in a tissue-engineering bioreactor. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12(6) :1169–1179, 2013.

[197] S. Nguyen, A. Allin-Pfister, and R. Bourouina. *Manuel d'anatomie et de physiologie*. Les Fondamentaux. Editions Lamarre, 2008.

[198] V.-H. Nguyen, T. Lemaire, and S. Naili. Numerical study of deformation-induced fluid flows in periodic osteonal matrix under harmonic axial loading. *Comptes Rendus Mécanique*, 337 (5) :268–276, 2009.

[199] V.-H. Nguyen, T. Lemaire, and S. Naili. Poroelastic behaviour of cortical bone under harmonic axial loading : A finite element study at the osteonal scale. *Medical Engineering and Physics*, 32(4) :384–390, 2010.

[200] V.-H. Nguyen, T. Lemaire, and S. Naili. Influence of interstitial bone microcracks on strain-induced fluid flow. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 10(6) :963–972, 2011.

[201] B. S. Noble. The osteocyte lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2) : 106–111, 2008.

[202] B. S. Noble and J. Reeve. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 159(1) :7–13, 2000.

[203] K. Norrish. The swelling of montmorillonite. *Discussions of the Faraday Society*, 18 : 120–134, 1954.

[204] C. Oddou, T. Lemaire, J. Pierre, and B. David. Hydrodynamics in porous media with applications to tissue engineering. In *Porous media : applications in biological systems and biotechnology*, pages 75–119. CRC Press, 2011.

[205] A. L. Olivares, È. Marsal, J. A. Planell, and D. Lacroix. Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. *Biomaterials*, 30(30) : 6142–6149, 2009.

[206] E. S. Orwoll. Toward an expanded understanding of the role of the periosteum in skeletal health. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(6) :949–954, 2003.

[207] M. Otter, V. Palmieri, D. Wu, K. Seiz, L. MacGinitie, and G. Cochran. A comparative analysis of streaming potentials *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Orthopaedic Research*, 10 (5) :710–719, 1992.

[208] M. L. Oyen. Poroelastic nanoindentation responses of hydrated bone. *Journal of Materials Research*, 23(5) :1307–1314, 2008.

[209] M. Panagiotis. Classification of non-union. *Injury*, 36(4) :S30–S37, 2005.

[210] J. Y. Park, S. J. Yoo, L. Patel, S. H. Lee, and S.-H. Lee. Cell morphological response to low shear stress in a two-dimensional culture microsystem with magnitudes comparable to interstitial shear stress. *Biorheology*, 47(3) :165–178, 2010.

[211] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaid, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, and G. Guillemin. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnology*, 18(9) :959–963, 2000.

[212] A. Phillips. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, 36(3) :S5–S7, 2005.

[213] E. Piccinini, N. Sadr, and I. Martin. Ceramic materials lead to underestimated DNA quantifications : a method for reliable measurements. *European Cells and Materials*, 20 :38–44, 2010.

[214] J. Pierre. *Analyse théorique de bioréacteurs et d'implants utilisés en génie tissulaire osseux et cartilagineux*. PhD thesis, Université Paris-Est, 2007.

[215] D. P. Pioletti, M. Montjovent, P. Zambelli, and L. Applegate. Bone tissue engineering using foetal cell therapy. *Swiss Medical Weekly*, 136(35/36) :557, 2006.

[216] A. Plecis, R. B. Schoch, and P. Renaud. Ionic transport phenomena in nanofluidics : experimental and theoretical study of the exclusion-enrichment effect on a chip. *Nano Letters*, 5 (6) :1147–1155, 2005.

[217] R. M. Porter, F. Liu, C. Pilapil, O. B. Betz, M. S. Vrahas, M. B. Harris, and C. H. Evans. Osteogenic potential of reamer irrigator aspirator (RIA) aspirate collected from patients undergoing hip arthroplasty. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(1) :42–49, 2009.

[218] C. Pouget, T. Dechev, E. Chevalier, M. Viana, and D. Chulia. Mouillabilité et énergie de surface de poudres pharmaceutiques : intérêt dans le choix d'un liant pour granulation par voie humide. *Matériaux 2006, 13-17 Novembre 2006 - Dijon, France*, 2006.

[219] P. Prendergast, R. Huiskes, and K. Søballe. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces. *Journal of Biomechanics*, 30(6) :539–548, 1997.

[220] D. E. Protsenko, K. Ho, and B. J. Wong. Survival of chondrocytes in rabbit septal cartilage after electromechanical reshaping. *Annals of Biomedical Engineering*, 39(1) :66–74, 2011.

[221] Y.-X. Qin, T. Kaplan, A. Saldanha, and C. Rubin. Fluid pressure gradients, arising from oscillations in intramedullary pressure, is correlated with the formation of bone and inhibition of intracortical porosity. *Journal of Biomechanics*, 36(10) :1427–1437, 2003.

[222] G. Reilly, T. Haut, C. Yellowley, H. Donahue, and C. Jacobs. Fluid flow induced PGE2 release by bone cells is reduced by glycolyx degradation whereas calcium sugnals are not. *Biorheology*, 40(6) :591–603, 2003.

[223] F. Remaggi, V. Cane, C. Palumbo, and M. Ferretti. Histomorphometric study on the osteocyte lacuno-canalicular network in animals of different species I. Woven-fibered and parallel-fibered bones. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 103(4) :145–155, 1998.

[224] A. Rémond, S. Naili, and T. Lemaire. Interstitial fluid flow in the osteon with spatial gradients of mechanical properties : a finite element study. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 7(6) :487–495, 2008.

[225] B. Reynaud and T. M. Quinn. Anisotropic hydraulic permeability in compressed articular cartilage. *Journal of Biomechanics*, 39(1) :131–137, 2006.

[226] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering and Physics*, 20(2) :92–102, 1998.

[227] B. Rüster, S. Göttig, R. J. Ludwig, R. Bistrian, S. Müller, E. Seifried, J. Gille, and R. Henschler. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108(12) :3938–3944, 2006.

[228] R. Sacco, P. Causin, P. Zunino, and M. T. Raimondi. A multiphysics/multiscale 2D numerical simulation of scaffold-based cartilage regeneration under interstitial perfusion in a bioreactor. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 10(4) :577–589, 2011.

[229] P. C. Salgado, P. C. Sathler, H. C. Castro, G. G. Alves, A. M. de Oliveira, R. C. de Oliveira, M. D. Maia, C. R. Rodrigues, P. G. Coelho, A. Fuly, et al. Bone remodeling, biomaterials and technological applications : revisiting basic concepts. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2(3) :318–328, 2011.

[230] J. Sanchez, Y. Li, A. Rubashkin, P. Iserovich, Q. Wen, J. Ruberti, R. Smith, D. Rittenband, K. Kuang, F. Diecke, et al. Evidence for a central role for electro-osmosis in fluid transport by corneal endothelium. *Journal of Membrane Biology*, 187(1) :37–50, 2002.

[231] V. Sansalone, J. Kaiser, S. Naili, and T. Lemaire. Interstitial fluid flow within bone canaliculi and electro-chemo-mechanical features of the canalicular milieu. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12(3) :533–553, 2012.

[232] S. Scaglione, A. Braccini, D. Wendt, C. Jaquiery, F. Beltrame, R. Quarto, and I. Martin. Engineering of osteoinductive grafts by isolation and expansion of ovine bone marrow stromal cells directly on 3D ceramic scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1) :181–187, 2006.

[233] E. H. Schemitsch, S. Investigators, and D. W. Sanders. The critical sized defect in the tibia : Is it critical ? Results from the sprint trial. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 94(Suppl XXXVIII) :70, 2012.

[234] A. Schindeler, M. M. McDonald, P. Bokko, and D. G. Little. Bone remodeling during fracture repair : the cellular picture. In *Seminars in Cell and Developmental Biology*, volume 19, pages 459–466. Elsevier, 2008.

[235] J. P. Schmitz and J. O. Hollinger. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 205 :299–308, 1986.

[236] P. Schneider, M. Meier, R. Wepf, and R. Müller. Towards quantitative 3D imaging of the osteocyte lacuno-canalicular network. *Bone*, 47(5) :848–858, 2010.

[237] J. E. Schroeder and R. Mosheiff. Tissue engineering approaches for bone repair : Concepts and evidence. *Injury*, 42(6) :609 – 613, 2011.

[238] M. Sen and T. Miclau. Autologous iliac crest bone graft : should it still be the gold standard for treating nonunions ? *Injury*, 38(1) :S75–S80, 2007.

[239] D. Sharma, C. Ciani, P. A. R. Marin, J. D. Levy, S. B. Doty, and S. P. Fritton. Alterations in the osteocyte lacunar-canalicular microenvironment due to estrogen deficiency. *Bone*, 51 (3) :488 – 497, 2012.

[240] L. Sherwood, A. Lockhart, and S. Molotchnikoff. *Physiologie humaine : A Human Perspective*. Anatomie - Physiologie. De Boeck Supérieur, 2006.

[241] V. I. Sikavitsas, G. N. Bancroft, H. L. Holtorf, J. A. Jansen, and A. G. Mikos. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25) : 14683–14688, 2003.

[242] H. Singh, S.-H. Teoh, H. T. Low, and D. Hutmacher. Flow modelling within a scaffold under the influence of uni-axial and bi-axial bioreactor rotation. *Journal of Biotechnology*, 119(2) :181–196, 2005.

[243] T. Smit, J. Huyghe, and S. Cowin. Estimation of the poroelastic parameters of cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 35(6) :829 – 835, 2002.

[244] P. N. Soucacos, Z. Dailiana, A. E. Beris, and E. O. Johnson. Vascularised bone grafts for the management of non-union. *Injury*, 37(1) :S41–S50, 2006.

[245] R. Steck, P. Niederer, and M. L. Knothe Tate. A finite element analysis for the prediction of load-induced fluid flow and mechanochemical transduction in bone. *Journal of Theoretical Biology*, 220(2) :249–259, 2003.

[246] P. Sucosky, D. F. Osorio, J. B. Brown, and G. P. Neitzel. Fluid mechanics of a spinner-flask bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(1) :34–46, 2004.

[247] R. Sullivan. Further study of the flow of air through porous media. *Journal of Applied Physics*, 12(6) :503–508, 1941.

[248] N. Sun, N. B. Wood, A. D. Hughes, S. A. Thom, and X. Y. Xu. Effects of transmural pressure and wall shear stress on ldl accumulation in the arterial wall : a numerical study using a multilayered model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(6) :H3148–H3157, 2007.

[249] S. Sun, I. Titushkin, and M. Cho. Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus. *Bioelectrochemistry*, 69(2) :133–141, 2006.

[250] R. Timpl, H. Wiedemann, V. Van Delden, H. Furthmayr, and K. Kühn. A network model for the organization of type iv collagen molecules in basement membranes. *European Journal of Biochemistry*, 120(2) :203–211, 1981.

[251] Y.-C. Toh, S. T. Ho, Y. Zhou, D. W. Hutmacher, and H. Yu. Application of a polyelectrolyte complex coacervation method to improve seeding efficiency of bone marrow stromal cells in a 3D culture system. *Biomaterials*, 26(19) :4149–4160, 2005.

[252] V. Toppets, V. Pastoret, V. De Behr, N. Antoine, C. Dessy, and A. Gabriel. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148 :1–13, 2004.

[253] R.-Y. Tsay and S. Weinbaum. Viscous flow in a channel with periodic cross-bridging fibres : exact solutions and Brinkman approximation. *Journal of Fluid Mechanics*, 226 :125–148, 1991.

[254] J. Utting, S. Robins, A. Brandao-Burch, I. Orriss, J. Behar, and T. Arnett. Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Experimental Cell Research*, 312(10) :1693 – 1702, 2006.

[255] J. van den Dolder, G. N. Bancroft, V. I. Sikavitsas, P. H. Spauwen, J. A. Jansen, and A. G. Mikos. Flow perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in titanium fiber mesh. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 64(2) :235–241, 2003.

[256] M. C. van der Meulen. Mechanics in skeletal development, adaptation and disease. *Phi-*

*losophical Transactions of the Royal Society of London. Series A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 358(1766) :565–578, 2000.

[257] S. van Gaalen, M. Kruyt, G. Meijer, A. Mistry, A. Mikos, J. van den Beucken, J. Jansen, K. de Groot, R. Cancedda, C. Olivo, M. Yaszemski, and W. Dhert. Chapter 19 - tissue engineering of bone. In *Tissue Engineering*, pages 559 – 610. Academic Press, Burlington, 2008.

[258] G. Vunjak-Novakovic, B. Obradovic, I. Martin, P. M. Bursac, R. Langer, and L. E. Freed. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnology Progress*, 14(2) :193–202, 1998.

[259] G. Vunjak-Novakovic, I. Martin, B. Obradovic, S. Treppo, A. Grodzinsky, R. Langer, and L. Freed. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 17(1) :130–138, 1999.

[260] J. Wang, Y. Asou, I. Sekiya, S. Sotome, H. Orii, and K. Shinomiya. Enhancement of tissue engineered bone formation by a low pressure system improving cell seeding and medium perfusion into a porous scaffold. *Biomaterials*, 27(13) :2738–2746, 2006.

[261] L. Wang, S. Fritton, S. Cowin, and S. Weinbaum. Fluid pressure relaxation depends upon osteonal microstructure : modeling an oscillatory bending experiment. *Journal of Biomechanics*, 32(7) :663–672, 1999.

[262] Q. Wang, J. D. Rager, K. Weinstein, P. S. Kardos, G. L. Dobson, J. Li, and I. J. Hidalgo. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood–brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2) :349–359, 2005.

[263] C. Weaver and R. P. Heaney. *Calcium in human health*. Springer, 2006.

[264] C. Weber, S. Pohl, R. Poertner, P. Pino-Grace, C. Wallrapp, P. Geigle, and P. Czermak. Bioreactor system for expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells : Design and scale-up strategy. *GIT Bioprocessing*, 1 :9–13, 2009.

[265] S. Weinbaum, S. Cowin, and Y. Zeng. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of Biomechanics*, 27(3) :339–360, 1994.

[266] D. Wen, C. Androjna, A. Vasanji, J. Belovich, and R. Midura. Lipids and collagen matrix restrict the hydraulic permeability within the porous compartment of adult cortical bone. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(3) :558–569, 2010.

[267] D. Wendt, A. Marsano, M. Jakob, M. Heberer, and I. Martin. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(2) :205–214, 2003.

[268] D. Wendt, S. Riboldi, M. Cioffi, and I. Martin. Bioreactors in tissue engineering : Scientific challenges and clinical perspectives. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, pages 1–27. Springer Berlin Heidelberg, 2008.

[269] D. Wendt, N. Timmins, J. Malda, F. Janssen, A. Ratcliffe, G. Vunjak-Novakovic, and I. Martin. Chapter 16 - bioreactors for tissue engineering. In *Tissue Engineering*, pages 483 – 506. Academic Press, Burlington, 2008.

[270] D. Wendt, S. Riboldi, M. Cioffi, and I. Martin. Bioreactors in tissue engineering : Scientific challenges and clinical perspectives. In *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*, volume 112 of *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pages 1–27. 2009.

[271] D. L. Wheeler and W. F. Enneking. Allograft bone decreases in strength *in vivo* over time. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 435 :36–42, 2005.

[272] D. Williams. Revisiting the definition of biocompatibility. *Medical Device Technology*, 14 (8) :10–13, 2003.

[273] D. Williams. Benefit and risk in tissue engineering. *Materials Today*, 7(5) :24–29, 2004.

[274] D. F. Williams. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press, 1999.

[275] X.-G. Wu and W.-Y. Chen. A hollow osteon model for examining its poroelastic behaviors : Mathematically modeling an osteon with different boundary cases. *European Journal of Mechanics-A/Solids*, 40 :34–49, 2013.

[276] S. Xu, D. Li, Y. Xie, J. Lu, and K. Dai. The growth of stem cells within $\beta$-TCP scaffolds in a fluid-dynamic environment. *Materials Science and Engineering : C*, 28(1) :164–170, 2008.

[277] M. Yamada, K. Tanemura, S. Okada, A. Iwanami, M. Nakamura, H. Mizuno, M. Ozawa, R. Ohyama-Goto, N. Kitamura, M. Kawano, et al. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25(3) :562–570, 2007.

[278] A. B. Yeatts and J. P. Fisher. Bone tissue engineering bioreactors : dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone*, 48(2) :171–181, 2011.

[279] L. You, S. Cowin, M. B. Schaffler, and S. Weinbaum. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *Journal of Biomechanics*, 34(11) :1375–1386, 2001.

[280] L. You, S. Weinbaum, S. Cowin, and M. Schaffler. Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anatomical Record*, 278(2) :505–513, 2004.

[281] T. Zappaterra, X. Ghislandi, A. Adam, S. Huard, F. Gindraux, D. Gallinet, D. Lepage, P. Garbuio, Y. Tropet, and L. Obert. Reconstruction des pertes de substance osseuse du membre supérieur par la technique de la membrane induite, étude prospective à propos de neuf cas. *Chirurgie de la Main*, 30(4) :255–263, 2011.

[282] Y. Zeng, S. Cowin, and S. Weinbaum. A fiber matrix model for fluid flow and streaming potentials in the canaliculi of an osteon. *Annals of Biomedical Engineering*, 22(3) :280–292, 1994.

[283] D. Zhang, S. Weinbaum, and S. Cowin. Estimates of the peak pressures in bone pore water. *Journal of Biomechanical Enigeering*, 120(6) :697–703, 1998.

[284] F. Zhao and T. Ma. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering : dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(4) :482–493, 2005.

[285] F. Zhao, P. Pathi, W. Grayson, Q. Xing, B. R. Locke, and T. Ma. Effects of oxygen transport on 3D human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures : Experiments and mathematical model. *Biotechnology Progress*, 21(4) :1269–1280, 2005.

[286] X. Zhou, J. Novotny, and L. Wang. Modeling fluorescence recovery after photobleaching in loaded bone : Potential applications in measuring fluid and solute transport in the osteocytic lacunar-canalicular system. *Annals of Biomedical Engineering*, 36(12) :1961–1977, 2008.

[287] N. I. zur Nieden, J. T. Cormier, D. E. Rancourt, and M. S. Kallos. Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 129(3) :421–432, 2007.

# Annexes

## Sommaire

**Annexe A : Analyse de sensibilité des paramètres utilisés lors de la détermination de la loi $\kappa_{HP} = f(\delta)$ . . . . . 201**

**Annexe B : Données expérimentales issues des tests d'ensemencement cellulaire . 203**

**Annexe C : Analyse de sensibilité des paramètres utilisés lors des tests expérimentaux d'ensemencement cellulaire . . . . . 205**

**Annexe D : Coupe histologique d'un échantillon en TCP$\beta$ après ensemencement cellulaire . . . . . 207**

**Annexe E : Tests expérimentaux d'osmose sur des échantillons de périoste fémoral ovin . . . . . 217**

# Annexe A : Analyse de sensibilité des paramètres utilisés lors de la détermination de la loi $\kappa_{HP} = f(\delta)$

Pour relier la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ d'un pore lacuno-canaliculaire à sa structure géométrique (voir chapitre 2), nous avons fait varier cinq paramètres un à un (les autres étant maintenus à leur valeur de référence), et simulé l'écoulement d'un fluide newtonien incompressible au sein de chaque pore ainsi obtenu. L'ensemble des paramètres utilisés est rappelé dans le tableau suivant.

| Paramètres | Données Y [280] | Données W [265] |
|---|---|---|
| $R_C$ | $\{7-8-9-10-11-12-\mathbf{13}-14-15\}\times10^{-8}$ m | $20\times10^{-8}$ m |
| $R_O$ | $\{35-40-45-\mathbf{50}-55-60-65-70-75-80\}\times10^{-9}$ m | $10\times10^{-8}$ m |
| $R_F$ | $\{3-4-\mathbf{5}-6-7-8\}\times10^{-9}$ m | $6\times10^{-10}$ m |
| $D_{LF}$ | $\{25-30-35-\mathbf{38}-45\}\times10^{-9}$ m | $\Delta$ |
| $N_F$ | $\{2-3-4-\mathbf{6}-8-12-15-16-18-30\}$ | $\pi(R_C+R_O)/\Delta$ |
| $\Delta$ | $\pi(R_C+R_O)/N_F$ | $7\times10^{-9}$ m |
| $\mu_f$ | $0.6\times10^{-3}$ Pa.s | |

TABLE A.1 – Paramètres géométriques des pores étudiés, d'après l'étude anatomique de You et al. [280] (données Y) et les estimations de Weinbaum et al. [265] (données W). Les valeurs en gras correspondent à la valeur de référence de chaque paramètre.

En définissant la taille caractéristique de pore $\delta$ selon

$$\delta \equiv \frac{\eta_f}{A} = \frac{V_f}{V}\frac{V}{A_{fs}} = \frac{V_f}{A_{fs}} = \frac{D_{lf}(R_c^2-R_o^2)-N_fR_f^2(R_c-R_o)}{2D_{lf}(R_c+R_o)+2N_fR_f(R_c-R_o)-2N_fR_f^2} \tag{A.1}$$

on peut alors tracer l'évolution de la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ en fonction de $\delta$, tel que présenté sur la figure A.1.

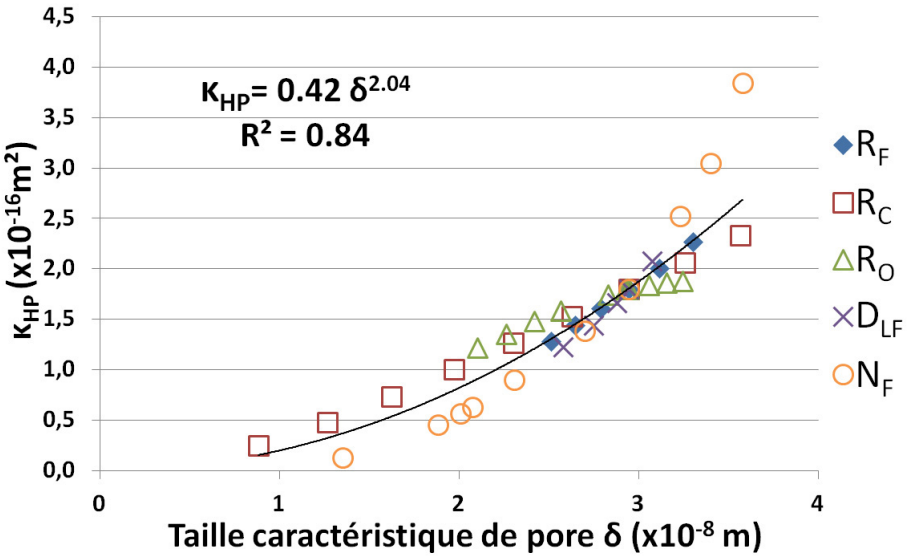



FIGURE A.1 – Evolution de la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ en fonction de la taille caractéristique de pore $\delta$

Pour identifier les paramètres géométriques ayant une influence statistiquement significative sur la valeur de la conductivité hydraulique, on réalise ensuite une analyse de la variance de $\kappa_{HP}$ [93], dont les résultats sont présentés dans le tableau A.2.

| Paramètres | Degrés de liberté | Somme des carrés des écarts | Variance | F-value | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| $R_C$ | 8 | 4.8965 | 0.61206 | 81608.34 | 3.75371 $\times 10^{-10}$ |
| $R_O$ | 9 | 0.5526 | 0.0614 | 8187.28 | 3.64585 $\times 10^{-8}$ |
| $R_F$ | 5 | 0.6853 | 0.13705 | 18273.72 | 8.38392 $\times 10^{-9}$ |
| $D_{LF}$ | 4 | 0.4805 | 0.12012 | 16015.85 | 1.16936 $\times 10^{-8}$ |
| $N_F$ | 9 | 14.167 | 1.57411 | 209880.75 | 5.54921 $\times 10^{-11}$ |
| Résidus | 4 | 0 | 0.00001 | | |
| Total | 39 | 20.7402 | | | |

TABLE A.2 – Table d'analyse de variance [93] de la conductivité hydraulique $\kappa_{HP}$ en fonction des paramètres géométriques étudiés.

Ainsi, tous les paramètres géométriques sont statistiquement significatifs au seuil $1\%$ (p-value $\leq 0.01$).

# Annexe B : Données expérimentales issues des tests d'ensemencement cellulaire

Le tableau B.1 regroupe les données expérimentales complètes issues des tests expérimentaux d'ensemencement cellulaire discutés au chapitre 3. Les lots cellulaires correspondent à des cellules obtenues à partir de la même ampoule P2 [1] (voir paragraphe 3.1.1). L'ensemble des tests a été réalisé à partir d'un unique prélèvement de moelle osseuse humaine.

| n°ech. | Lot cell. | $V_D$ ($10^{-4}$ m/s) | $N_i$ ($\times 10^3$) | $T_p$ (min) | Nature chargt. | $d_{fl}$ (cm) | $cell_{v,b}$ ($\times 10^3$) | $cell_{m,b}$ ($\times 10^3$) | $cell_{v,a}$ ($\times 10^3$) | $cell_{m,a}$ ($\times 10^3$) | $cell_d$ ($\times 10^3$) | $f_{ens}$ | $f_{viab}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | B | 0 | 1000 | 0 | aucun | 0 | 790 | 200 | 20 | 0 | -10 | 0.98 | 0.80 |
| 2 | A | 1.73 | 1000 | 30 | continu | 1 | 600 | 270 | 210 | 130 | -210 | 0.72 | 0.67 |
| 3 | AB | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 1 | 590 | 200 | 70 | 50 | 90 | 0.79 | 0.72 |
| 4 | B | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 1 | 970 | 220 | 180 | 60 | -430 | 0.83 | 0.80 |
| 5 | E | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 1 | 350 | 170 | 165 | 155 | 160 | 0.52 | 0.61 |
| 6 | F | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 1.8 | 440 | 195 | 190 | 70 | 105 | 0.63 | 0.70 |
| 7 | G | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 1.8 | 310 | 205 | 200 | 120 | 165 | 0.51 | 0.61 |
| 8 | G | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 1.8 | 315 | 135 | 355 | 140 | 55 | 0.45 | 0.71 |
| 9 | B | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 3.2 | 390 | 90 | 400 | 90 | 30 | 0.48 | 0.81 |
| 10 | B | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 3.2 | 525 | 265 | 70 | 40 | 100 | 0.79 | 0.66 |
| 11 | F | 3.17 | 1000 | 30 | continu | 3.2 | 245 | 110 | 105 | 50 | 490 | 0.355 | 0.69 |
| 12 | G | 9.7 | 1000 | 30 | continu | 1 | 435 | 290 | 110 | 55 | 110 | 0.72 | 0.61 |
| 13 | G | 9.7 | 1000 | 30 | continu | 1 | 305 | 150 | 195 | 85 | 265 | 0.45 | 0.68 |
| 14 | G | 9.7 | 1000 | 30 | continu | 1 | 295 | 185 | 190 | 70 | 260 | 0.48 | 0.66 |
| 15 | C | 9.7 | 1000 | 30 | continu | 1.8 | 515 | 240 | 110 | 90 | 45 | 0.75 | 0.65 |
| 16 | C | 9.7 | 1000 | 30 | continu | 1.8 | 550 | 295 | 80 | 80 | -5 | 0.84 | 0.63 |
| 17 | G | 9.7 | 1000 | 30 | continu | 1.8 | 230 | 160 | 170 | 90 | 350 | 0.39 | 0.61 |
| 18 | C | 9.7 | 1000 | 5 | continu | 1.8 | 410 | 220 | 325 | 165 | -120 | 0.56 | 0.66 |
| 19 | C | 9.7 | 1000 | 5 | continu | 1.8 | 280 | 140 | 400 | 140 | 40 | 0.42 | 0.71 |
| 20 | C | 9.7 | 1000 | 5 | continu | 1.8 | 355 | 260 | 370 | 240 | -225 | 0.50 | 0.59 |
| 21 | C | 9.7 | 2500 | 5 | continu | 1.8 | 1070 | 95 | 925 | 400 | 10 | 0.47 | 0.80 |
| 22 | C | 9.7 | 2500 | 5 | continu | 1.8 | 760 | 430 | 260 | 210 | 840 | 0.48 | 0.61 |
| 23 | C | 9.7 | 2500 | 5 | continu | 1.8 | 710 | 260 | 370 | 200 | 960 | 0.39 | 0.70 |
| 24 | D | 9.7 | 2000 | 0 | pulsé | 1.8 | 800 | 375 | 465 | 345 | 15 | 0.59 | 0.64 |
| 25 | D | 9.7 | 2000 | 0 | pulsé | 1.8 | 680 | 245 | 265 | 185 | 625 | 0.46 | 0.69 |
| 26 | D | 9.7 | 2000 | 0 | pulsé | 1.8 | 385 | 205 | 315 | 235 | 860 | 0.29 | 0.61 |
| 27 | D | 9.7 | 2000 | 0 | pulsé | 1.8 | 180 | 160 | 410 | 250 | 1000 | 0.17 | 0.59 |

TABLE B.1 – Données expérimentales issues des tests d'ensemencement cellulaire. $V_D$ : vitesse de perfusion, $N_i$ : nombre de cellules initial, $T_p$ : temps de pause observé entre l'injection cellulaire et le début de l'écoulement, $d_{fl}$ : distance perfusée, $cell_{v,b}$ : cellules vivantes après ensemencement (biomatériau), $cell_{m,b}$ : cellules mortes après ensemencement (biomatériau), $cell_{v,a}$ : cellules vivantes après ensemencement (partie aval du montage), $cell_{m,a}$ : cellules mortes après ensemencement (partie aval du montage), $cell_d$ : cellules détruites au cours du protocole, $f_{ens}$ : fraction cellulaire ensemencée, $f_{viab}$ : taux de viabilité cellulaire.

1. Rappel : le stade Pk correspond au k-ième changement de flasque de culture lors de la phase d'amplification.

# Annexe C : Analyse de sensibilité des paramètres utilisés lors des tests expérimentaux d'ensemencement cellulaire

Les tests expérimentaux présentés au chapitre 3 ont permis d'évaluer l'évolution du taux de viabilité cellulaire et de la fraction de cellules initiales ensemencée à la fin du protocole sur un biomatériau poreux en phosphate de calcium, en fonction de cinq paramètres physiques rappelés dans le tableau C.1.

| Paramètres | Valeurs | Remarques |
|---|---|---|
| Vitesse d'écoulement | $\{0 - 3.17 - 9.7\} \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$ | adapté de Wendt et al. [267] |
| Distance perfusée | $\{1 - 1.8 - 3.2\}$ cm | |
| Nature du flux | continu, pulsé | |
| Densité cellulaire | $\{1 - 2 - 2.5\} \times 10^6$ cellules/échantillon | $10^6$ cellules/échantillon correspond à Braccini et al. [24] |
| Temps de pause avant flux | $\{0$ (flux pulsé$) - 5 - 30\}$ min | |

TABLE C.1 – Paramètres physiques étudiés et plages de valeurs correspondantes

Les données expérimentales complètes correspondant à ces tests sont présentées dans l'annexe B. Après avoir constaté l'absence d'influence de la nature du flux sur les deux réponses étudiées (fraction de cellules greffée et taux de viabilité cellulaire, voir paragraphe 3.2.1 du chapitre 3), on procède, pour chacune d'entre elles, à une analyse de variance avec les autres paramètres, dont les résultats sont présentés dans le tableau C.2.

| Fraction des cellules initiales ensemencée | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Paramètres | Degrés de liberté | Somme des carrés des écarts | Variance | F-value | p-value |
| Vitesse | 2 | 0.05216 | 0.02608 | 2.15 | 0.1455 |
| Temps de pause avant flux | 1 | 0.00478 | 0.00478 | 0.39 | 0.5382 |
| Distance perfusée | 2 | 0.04961 | 0.0248 | 2.04 | 0.1585 |
| Densité cellulaire | 1 | 0.00107 | 0.00107 | 0.09 | 0.7699 |
| Résidus | 18 | 0.21843 | 0.01213 | | |
| Total | 26 | 0.56432 | | | |
| **Taux de viabilité cellulaire** | | | | | |
| Paramètres | Degrés de liberté | Somme des carrés des écarts | Variance | F-value | p-value |
| Vitesse | 2 | 0.00123 | 0.00062 | 0.03 | 0.9709 |
| Temps de pause avant flux | 1 | 0.00613 | 0.00613 | 0.29 | 0.5939 |
| Distance perfusée | 2 | 0.01275 | 0.00638 | 0.31 | 0.74 |
| Densité cellulaire | 1 | 0.01403 | 0.01403 | 0.67 | 0.4225 |
| Résidus | 18 | 0.37475 | 0.02082 | | |
| Total | 26 | 0.5589 | | | |

TABLE C.2 – Table d'analyse de variance de la fraction de cellules initiales ensemencée et du taux de viabilité cellulaire en fonction des paramètres expérimentaux.

Ainsi, pour les tests réalisés, aucun des paramètres testés n'a d'influence statistiquement significative sur les deux réponses étudiées. Cela est notamment dû au faible nombre d'échantillons traités, et à la grande variabilité de la structure des échantillons poreux, qui ajoute de la variance aux résultats obtenus.

# Annexe D : Coupe histologique d'un échantillon en TCP$\beta$ après ensemencement cellulaire

Cette annexe regroupe différentes vues obtenues par microscopie optique classique d'une lame histologique issue d'un échantillon ensemencé avec $1$ million de cellules et un écoulement continu de vitesse moyenne $3.17 \times 10^{-4}$ m.s$^{-1}$, effectué $30$ minutes après l'injection des cellules et maintenu sur une distance perfusée de $3.2$ cm, pour comparaison avec l'échantillon présenté dans le chapitre 3 (voir figures 3.12 et 3.13). On peut alors observer que, cette fois encore, la majorité des cellules reste au niveau de la face amont du biomatériau, bien que quelques cellules soient dispersées dans l'ensemble du volume du milieu poreux.

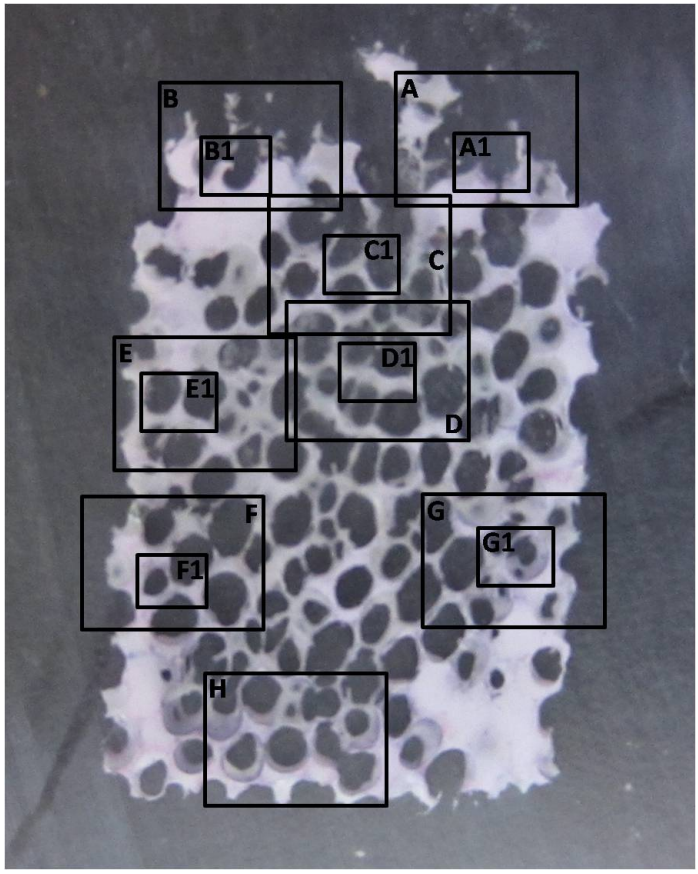
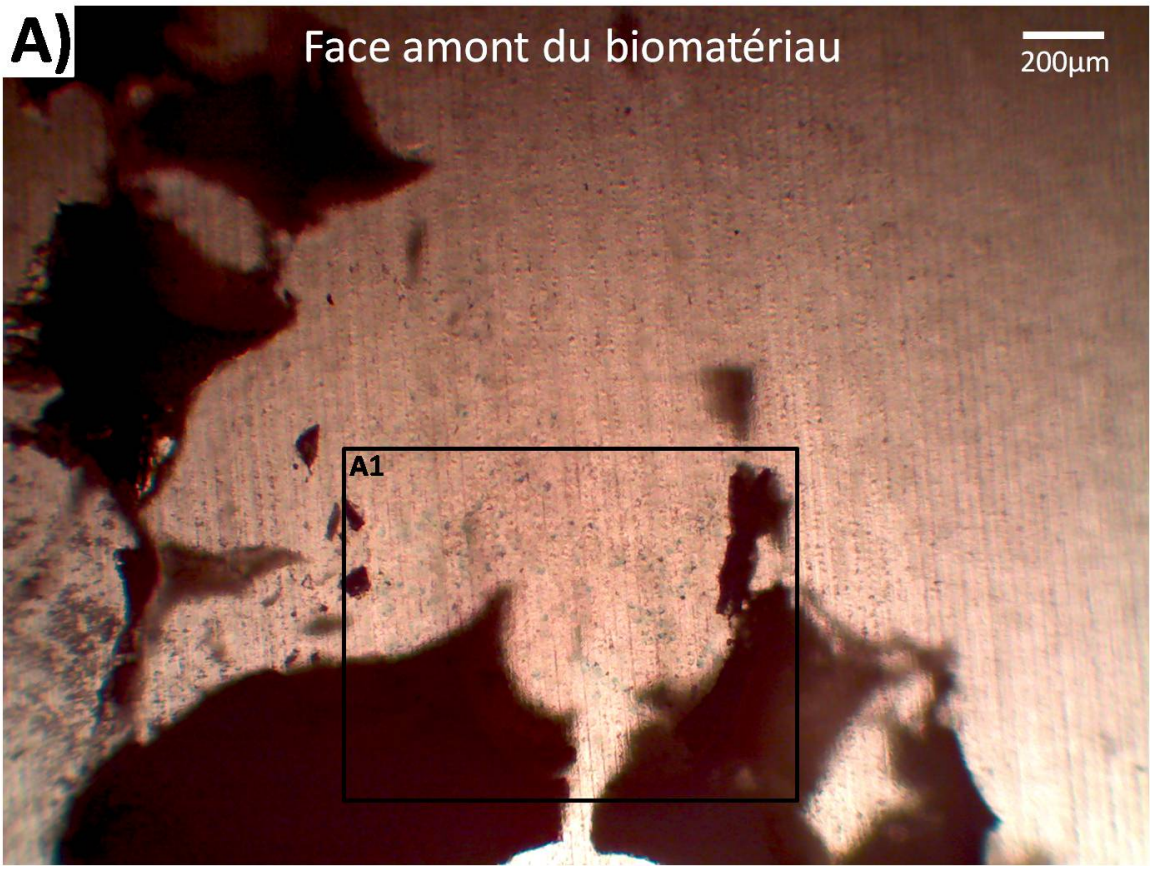
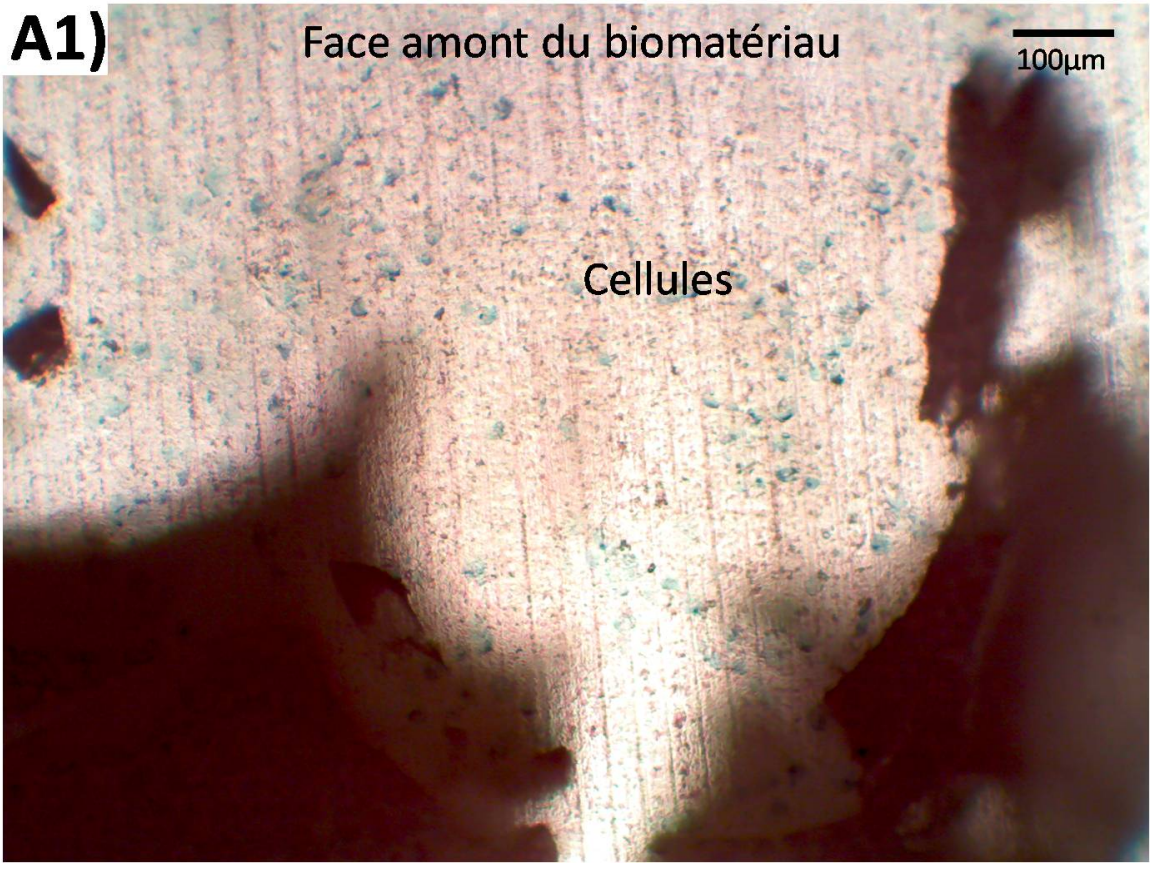
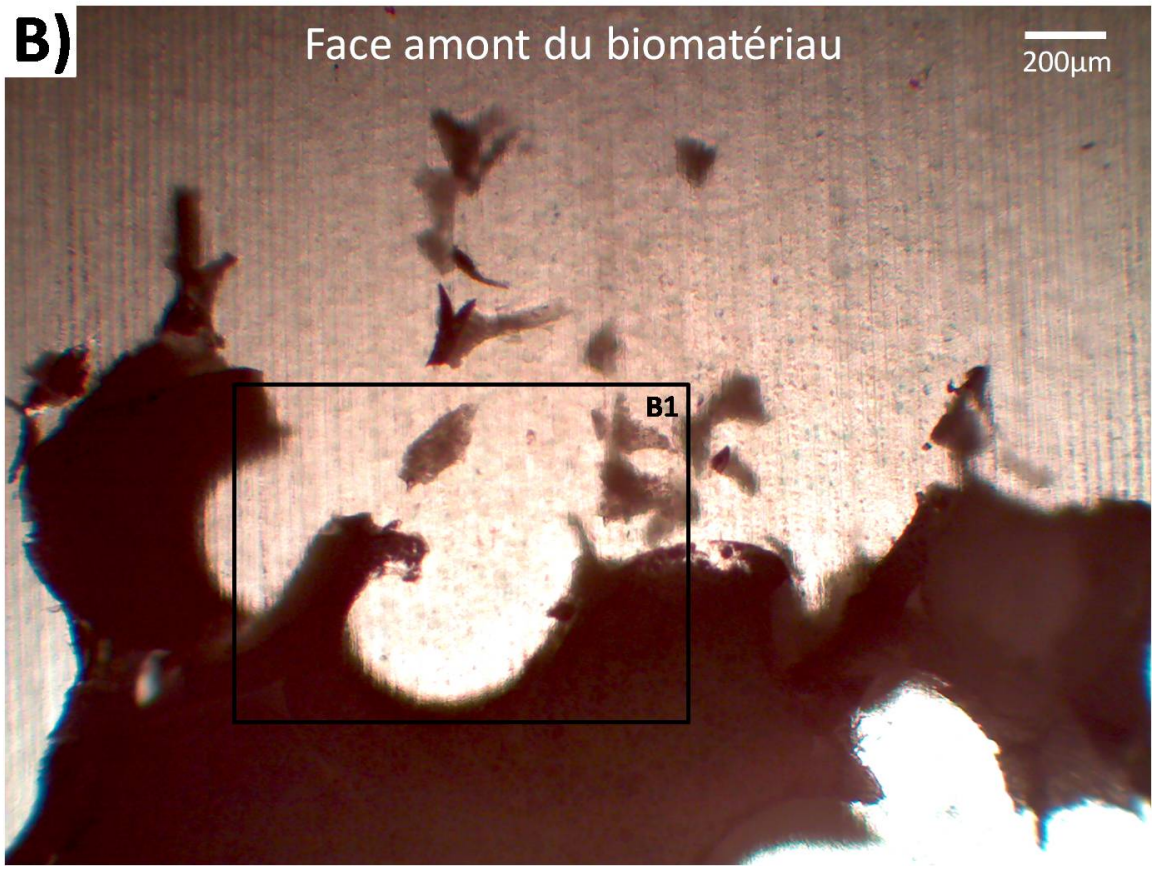
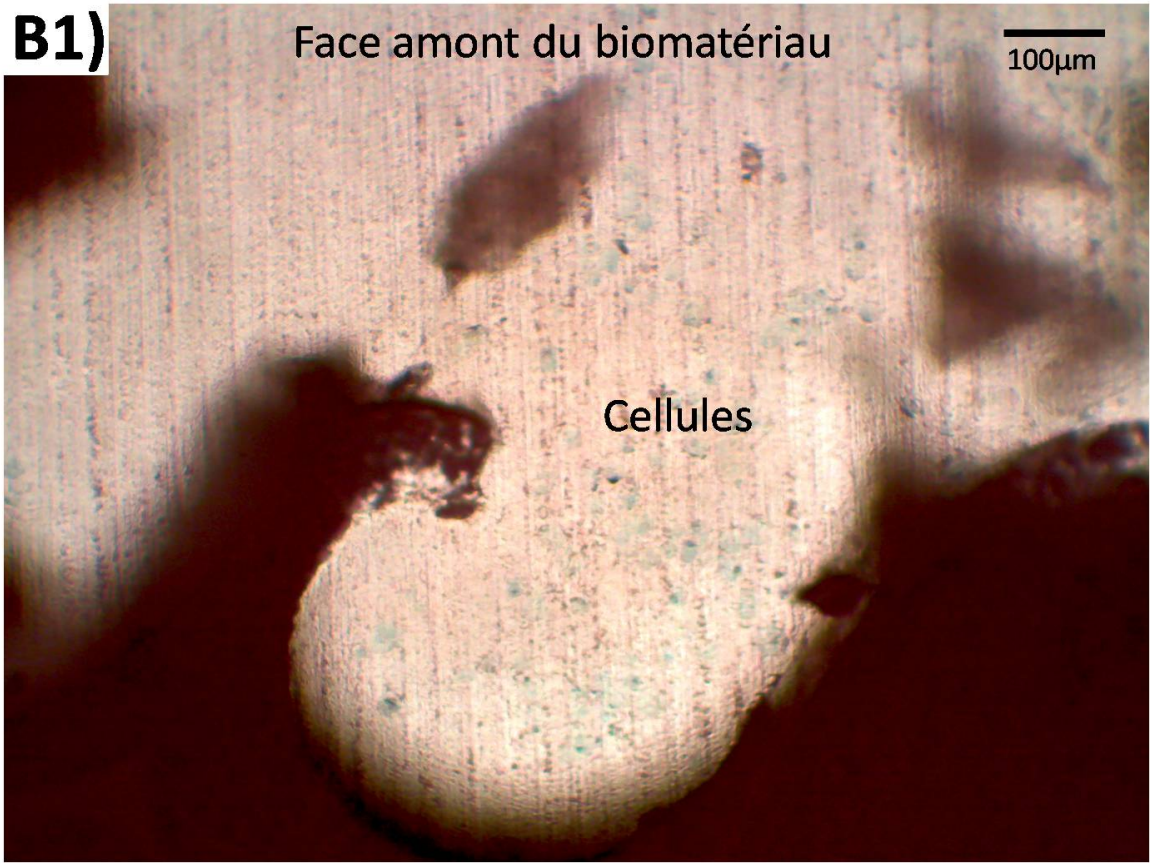


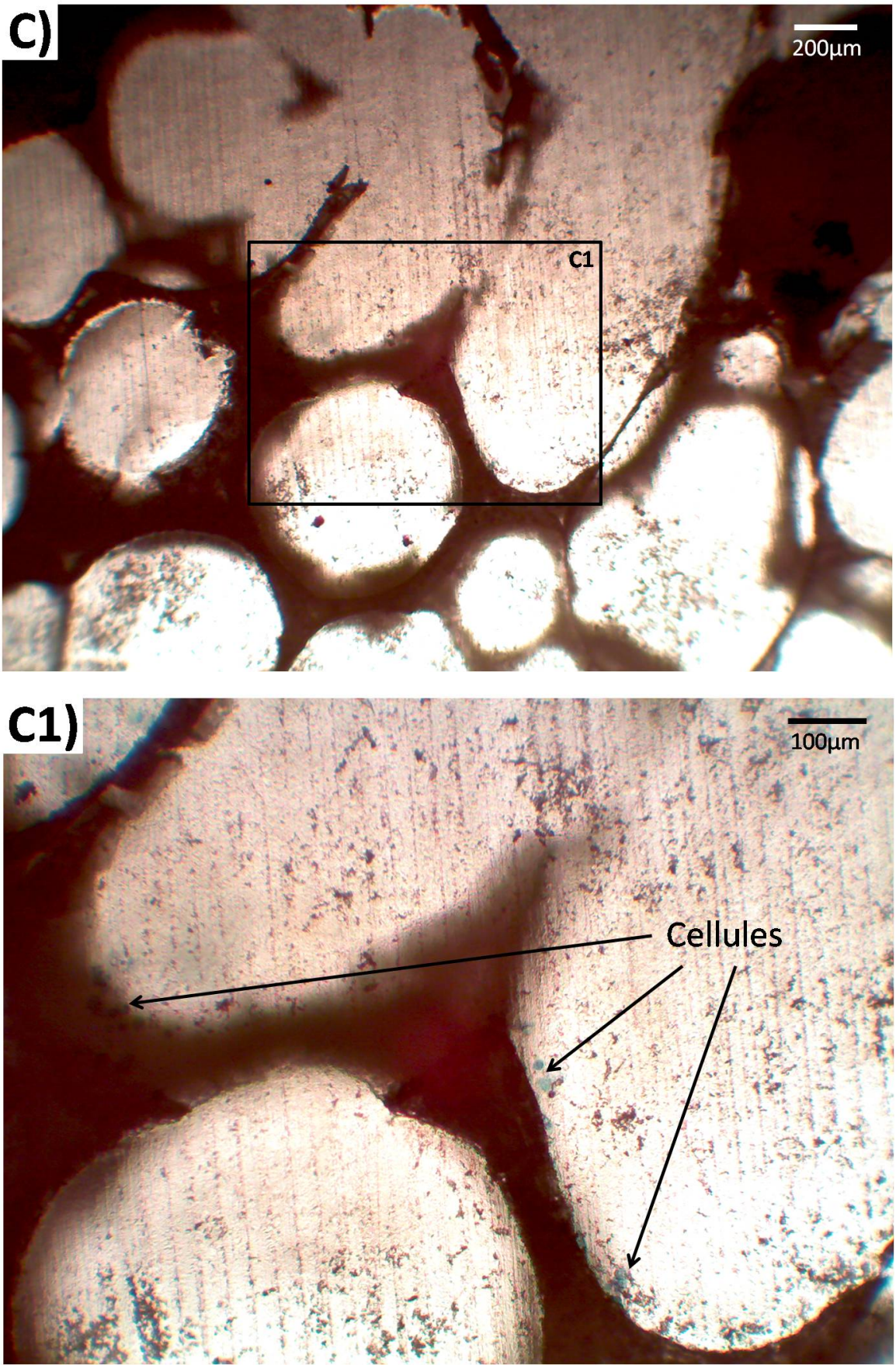

FIGURE D.1 – Répartition des cellules au sein d'un échantillon poreux après ensemencement cellulaire. Vue en coupe de l'échantillon étudié. Les rectangles représentent les zones correspondant aux agrandissements présentés dans les figures D.2.A à D.2.H.

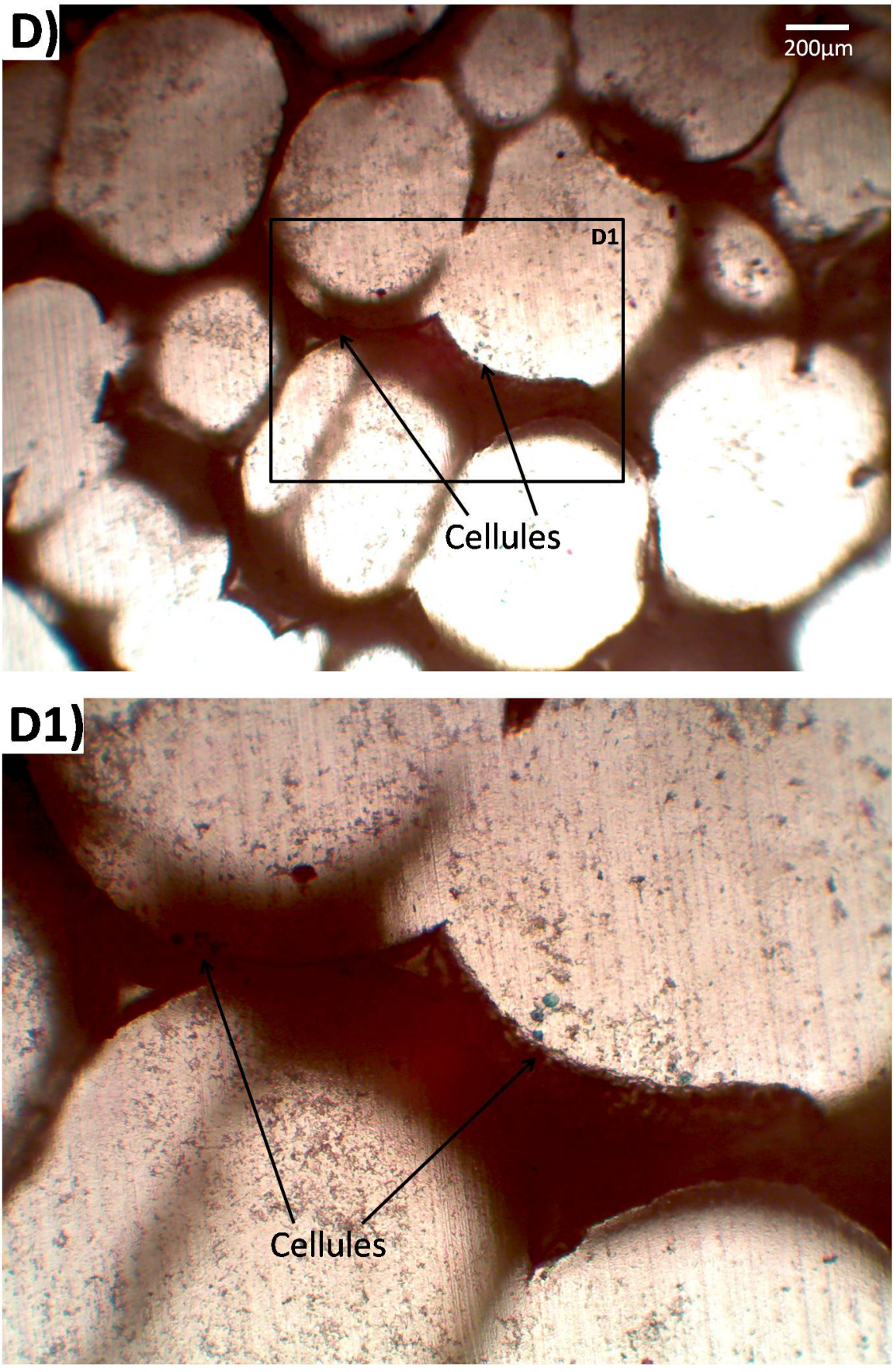

A)
Face amont du biomatériau
200µm
A1

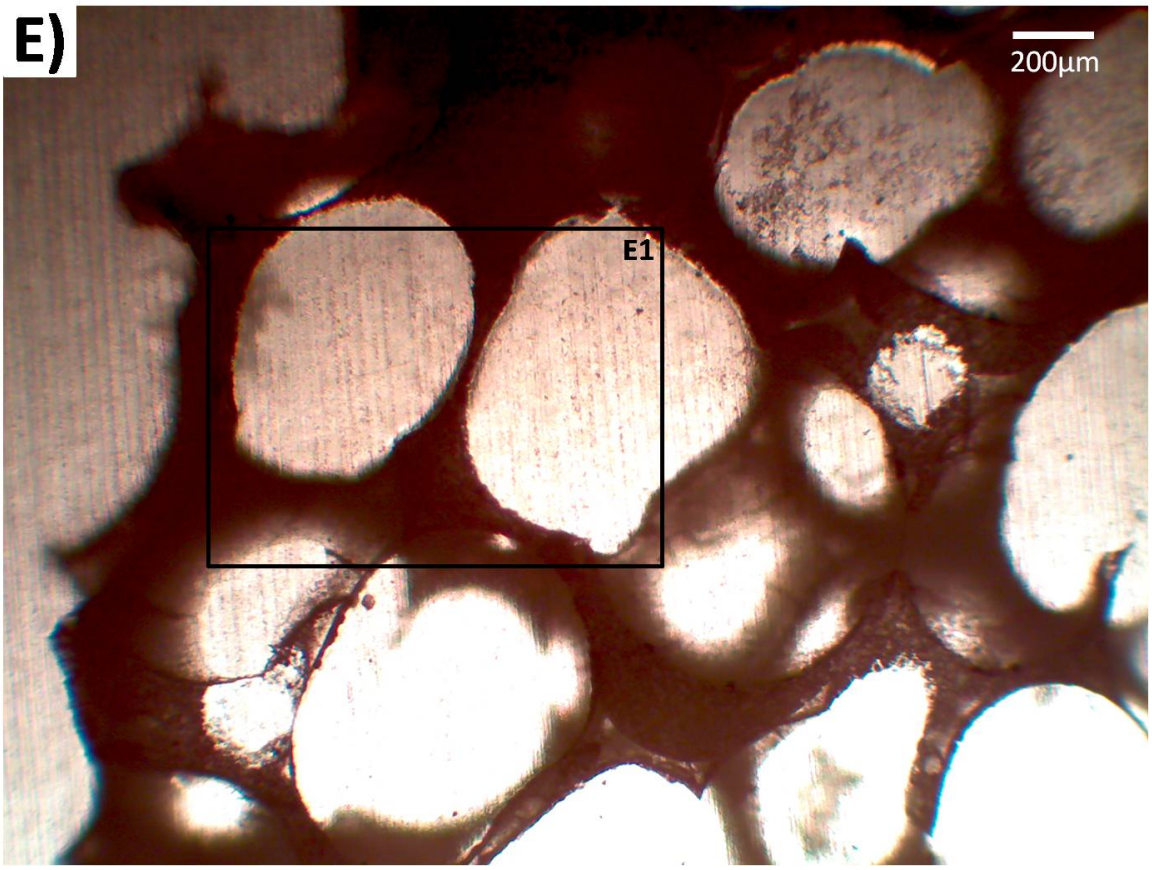

A1)
Face amont du biomatériau
100µm
Cellules

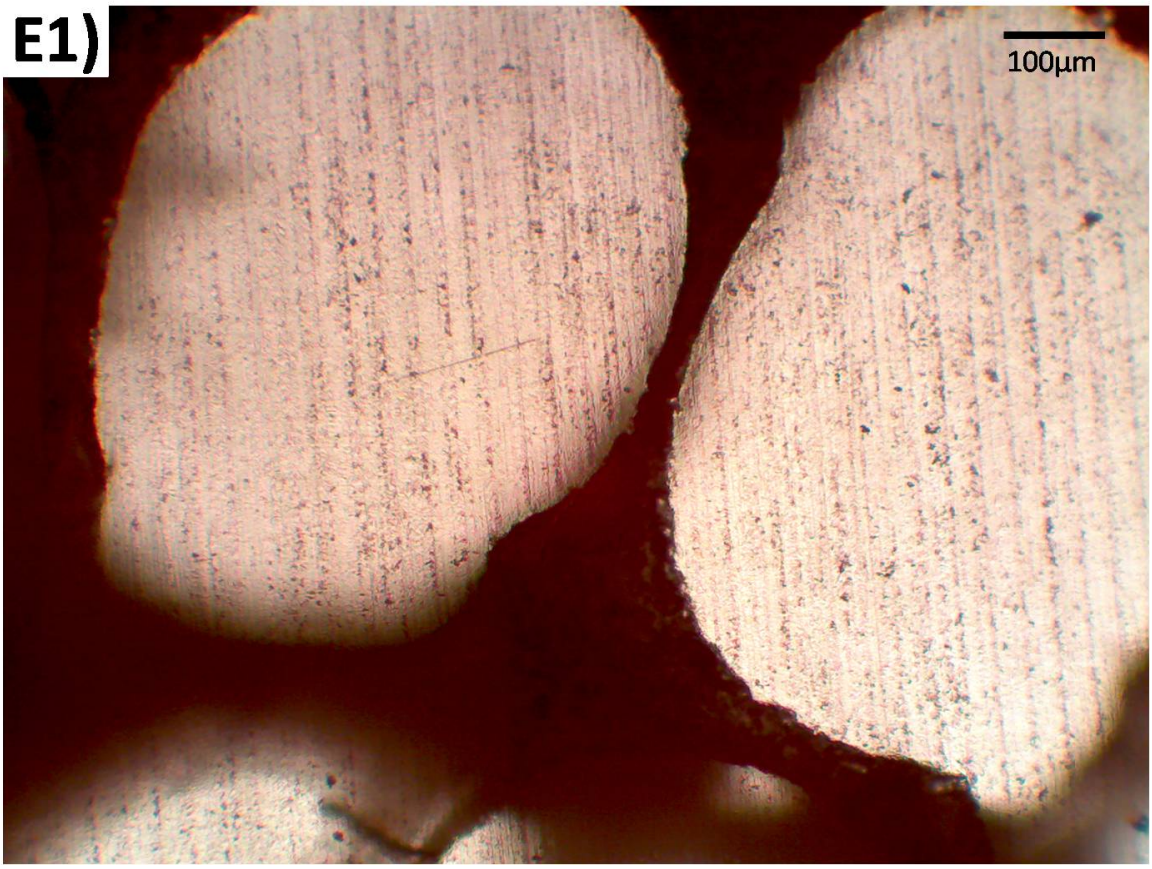

B)
Face amont du biomatériau
200µm
B1

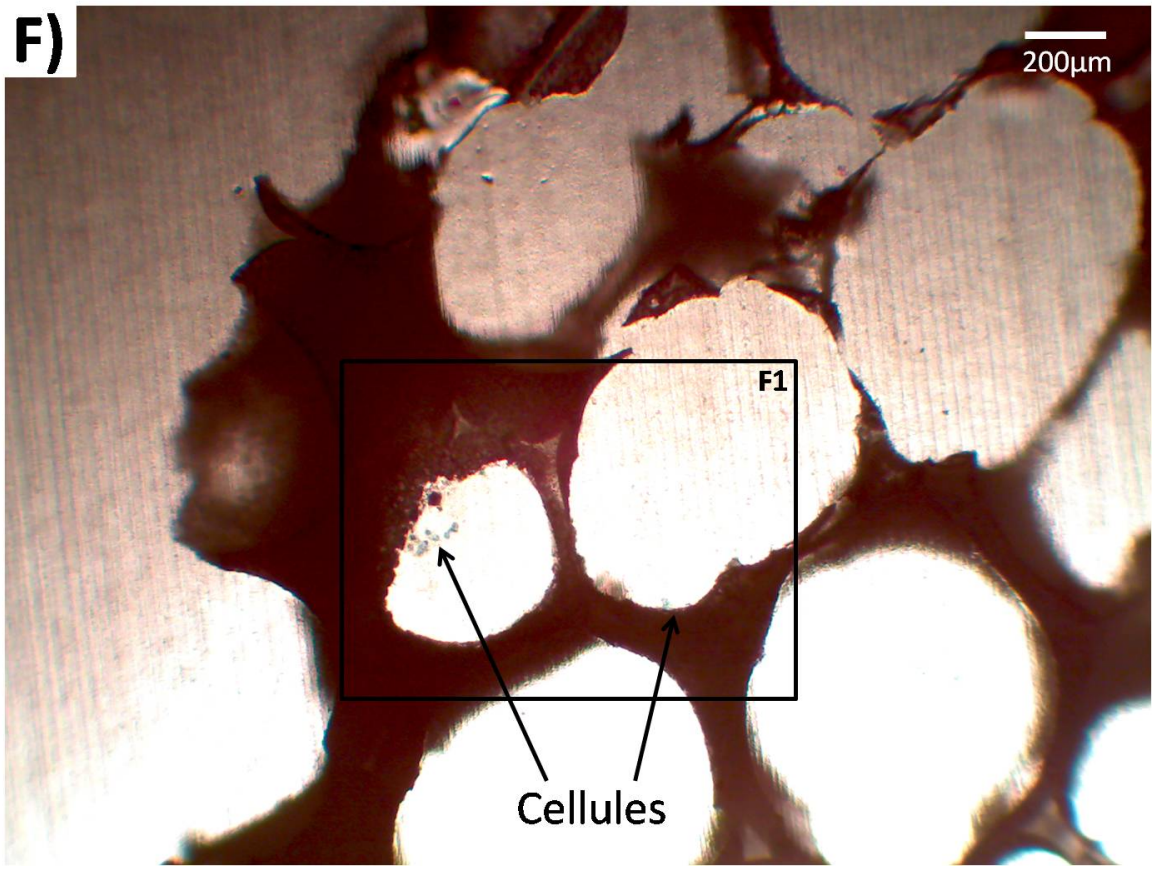

B1)
Face amont du biomatériau
100µm
Cellules

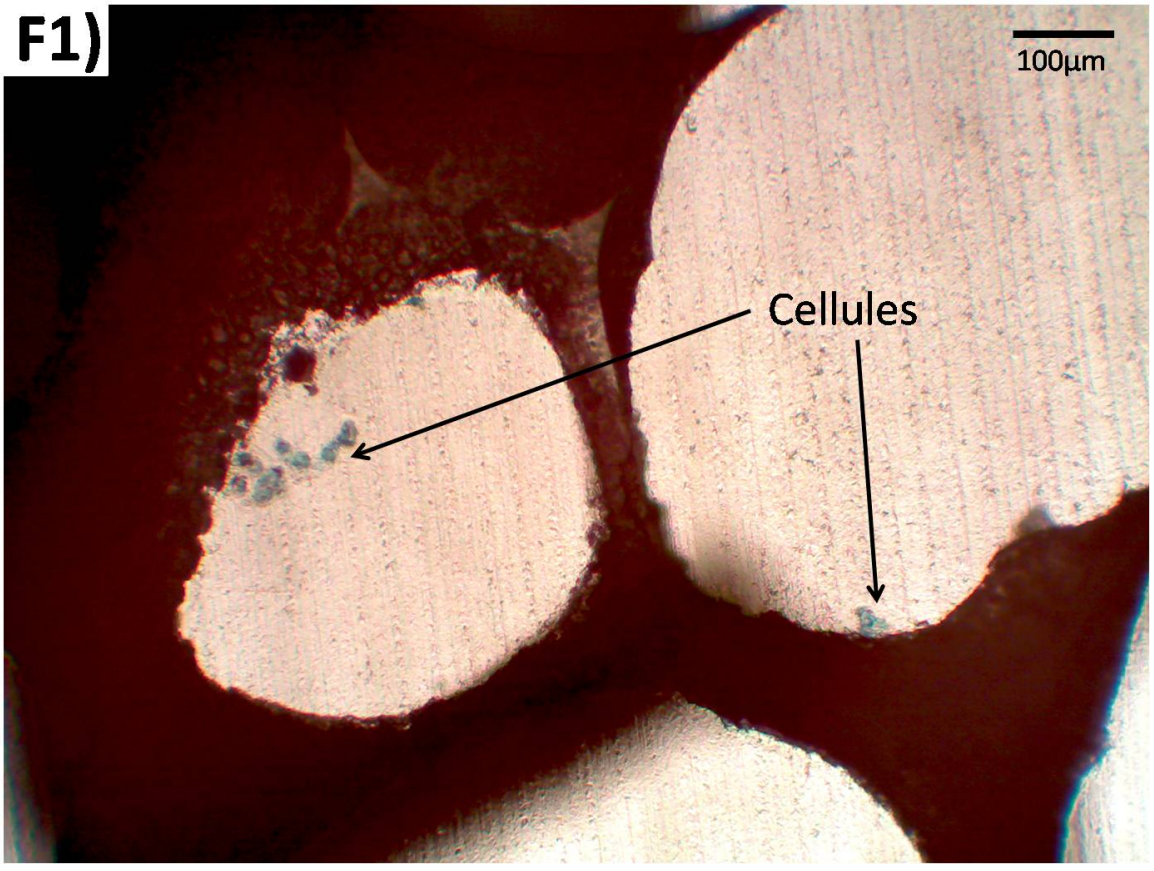

C)
200µm
C1
C1)
100µm
Cellules

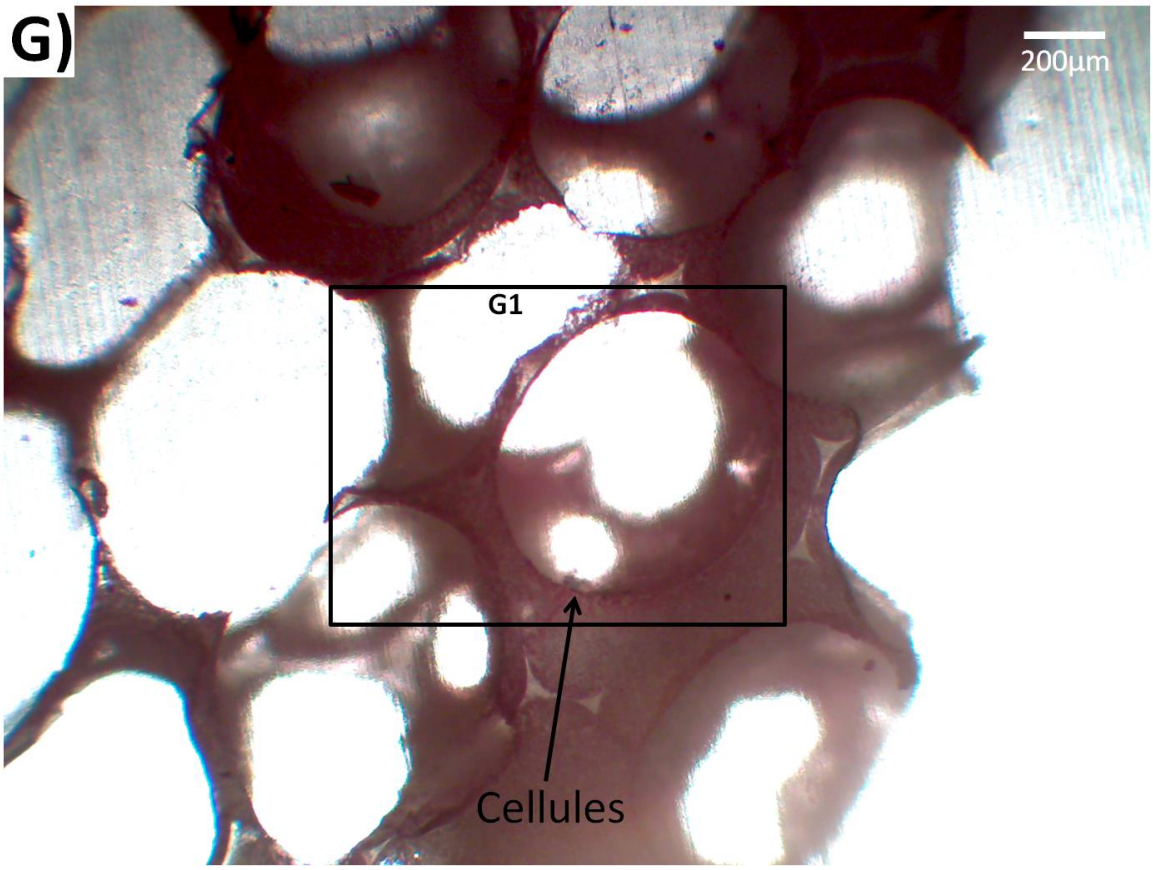

D)
200µm
D1
Cellules
D1)
Cellules

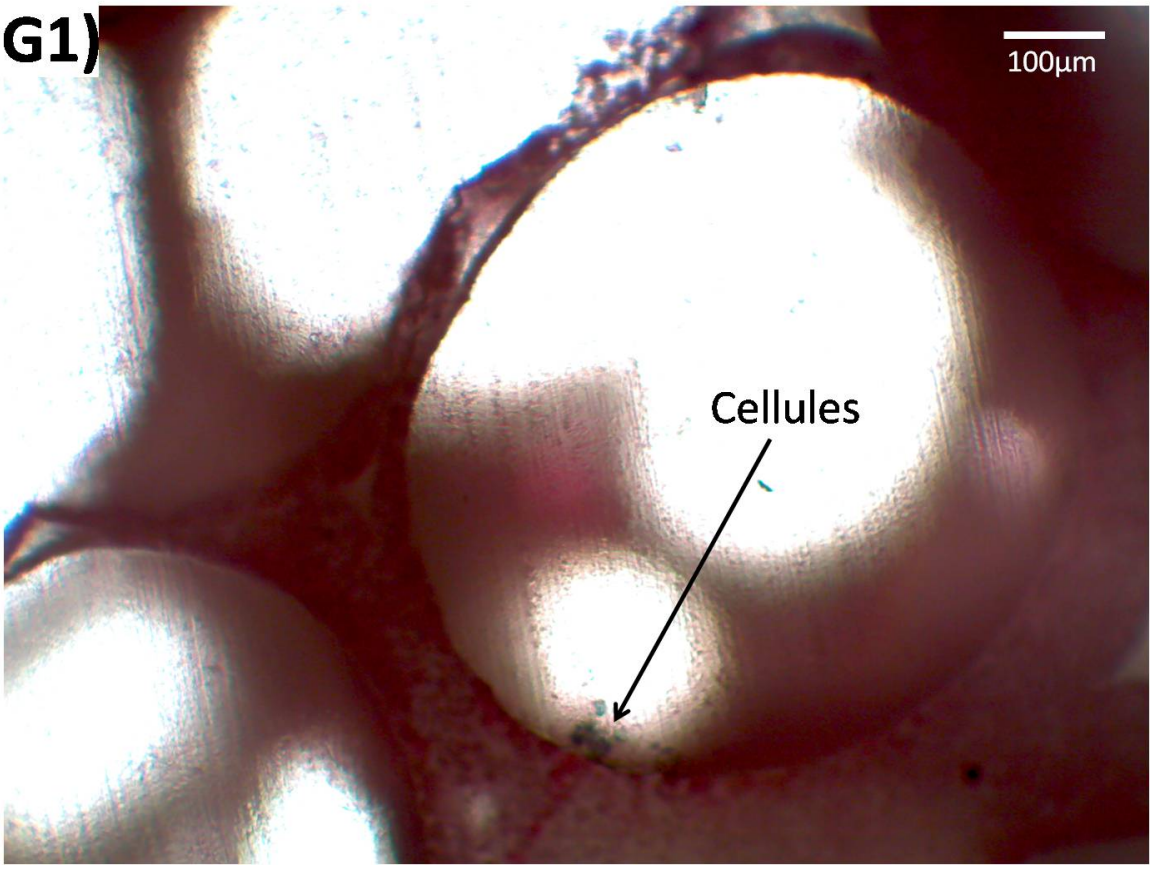

E)
200µm
E1


E1)
100µm


F)
200µm
F1
Cellules


F1)
100µm
Cellules


G)
200µm
G1
Cellules


G1)
100µm
Cellules

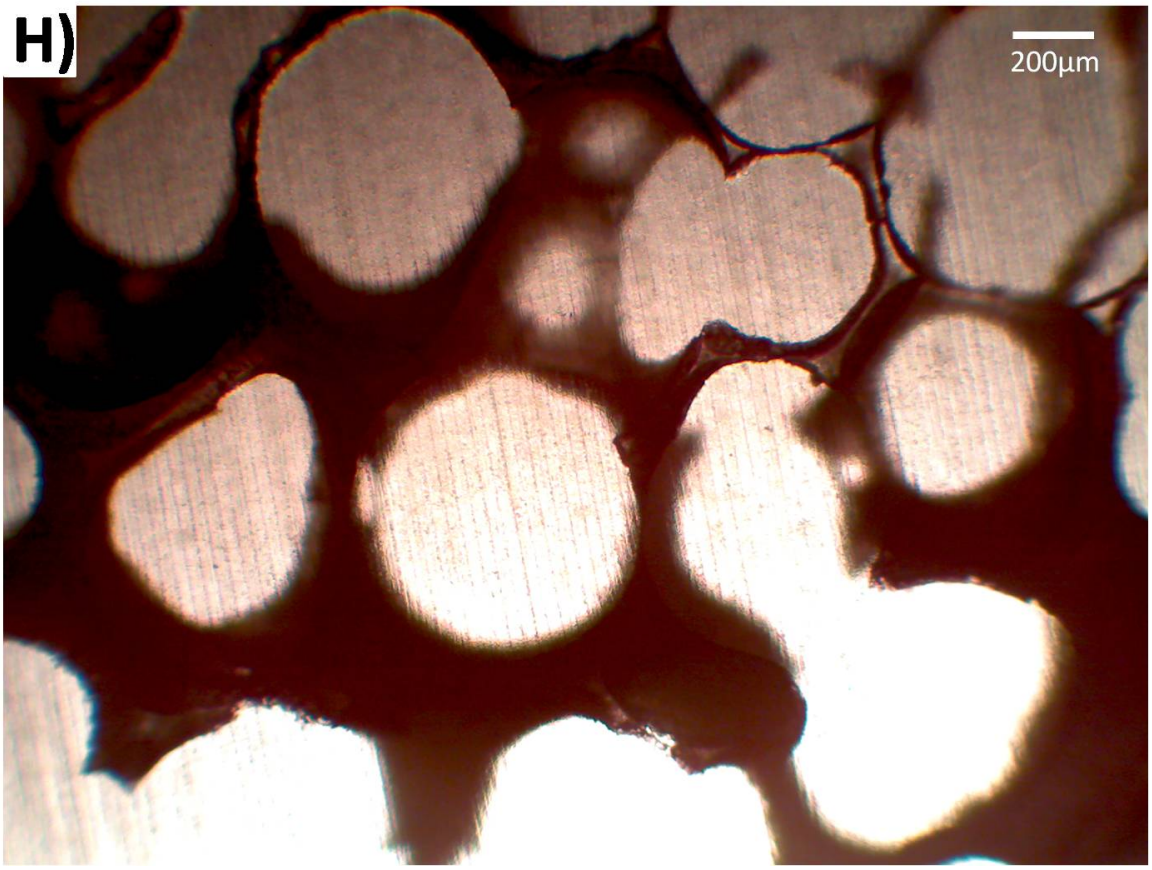



FIGURE D.2 – Coupe histologique d'un échantillon poreux ensemencé dans un bioréacteur à perfusion. Observation au microscope optique après coloration au bleu de Stevenel et à la picro-fishine selon van Gieson. Les cellules sont teintées en bleu et indiquées par des flèches. Les figures D.2.E et D.2.H correspondent à des zones vides de cellules.

Il apparaît donc que le protocole utilisé ne permet pas de faire pénétrer les cellules dans le cœur du biomatériau poreux.

# Annexe E : Tests expérimentaux d'osmose sur des échantillons de périoste fémoral ovin

En complément des mesures expérimentales de perméabilité présentées au chapitre 5, une série de tests d'osmose membranaire a été réalisée pour observer les mécanismes intervenant dans le retour à l'équilibre chimique de cette membrane, plongée dans une solution hypo-osmotique. Pour cela, des échantillons de périoste ont été prélevés sur la face antérieure de fémurs d'agneaux de moins de six mois issus de la boucherie, en suivant le protocole exposé au paragraphe 5.1 (voir chapitre 5). Ils ont ensuite été placés entre deux compartiments saturés avec une solution hypo-osmotique de composition identique à celle utilisée dans le chapitre 5, et l'ensemble a été relié à un voltmètre (la cathode étant placée côté muscle), afin de mesurer la différence de potentiel de la membrane toutes les secondes pendant 6 heures (voir figure E.1). D'après les travaux de McBride et al. [183], les mesures sont donc effectuées sur une durée suffisante pour observer l'ensemble du retour à l'équilibre chimique des échantillons.

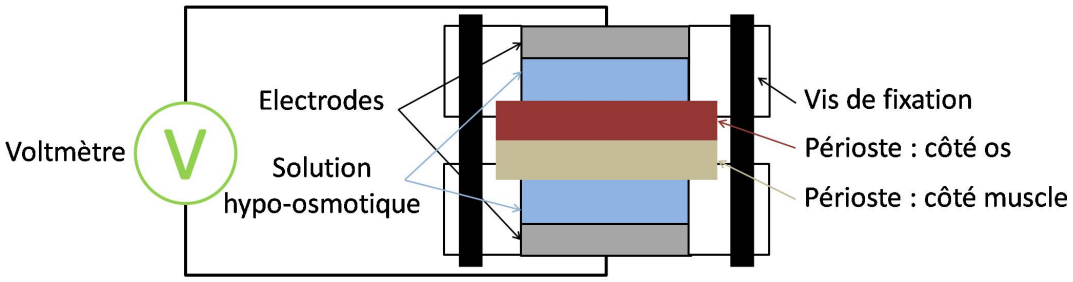



FIGURE E.1 – Dispositif expérimental mis en place pour la réalisation des tests d'osmose. L'échantillon de périoste étudié est placé entre deux compartiments saturés en fluide. L'ensemble est ensuite relié à un voltmètre pour mesurer l'évolution de la tension aux bornes du périoste au cours du temps.

Afin de déterminer un éventuel impact de la cryopréservation sur les mécanismes de transport ioniques à travers cette membrane, les tests ont été réalisés avec des échantillons réfrigérés ($n = 4$), ou congelés pendant une durée minimum de 24 h ($n = 3$). Dans les deux cas, les os sont ensuite laissés à température ambiante jusqu'à ce qu'ils aient atteint la température de la pièce, avant de procéder au prélèvement des échantillons de périoste.

La figure E.2 regroupe les résultats obtenus pour les échantillons réfrigérés (mais non congelés).

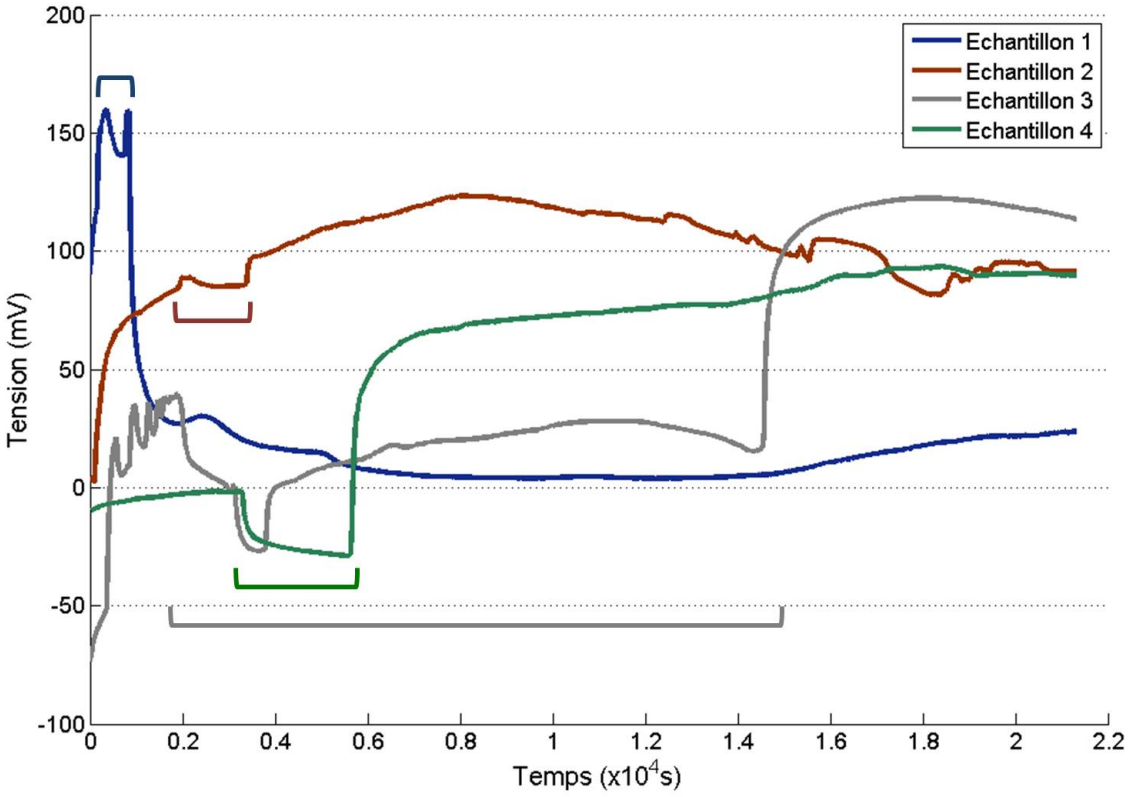



FIGURE E.2 – Evolution de la tension aux bornes du périoste au cours du temps (cathode côté muscle) pour quatre échantillons de périoste fémoral ovin réfrigérés (mais non congelés). Les crochets horizontaux encadrent les zones de transfert ionique important.

La lecture de ces courbes semble assez délicate. Néanmoins, il est possible d'identifier deux mécanismes de retour à l'équilibre dans les zones délimitées par les crochets horizontaux sur la figure E.2 : après une phase initiale de croissance, on observe un effondrement brusque de la tension mesurée, qui correspond à un transfert important et rapide d'ions d'un côté à l'autre de la membrane. Puis, après un palier de durée variable, on mesure une augmentation brutale de la tension, qui traduit un deuxième transfert massif d'ions, dans la direction opposée au premier. Enfin, la dernière partie de la courbe, plus stable, correspond au retour à l'équilibre de l'échantillon. Le comportement bidirectionnel du périoste est donc bien visible sur ces essais.

En revanche, les échantillons congelés présentent un comportement différent, présenté sur la figure E.3.

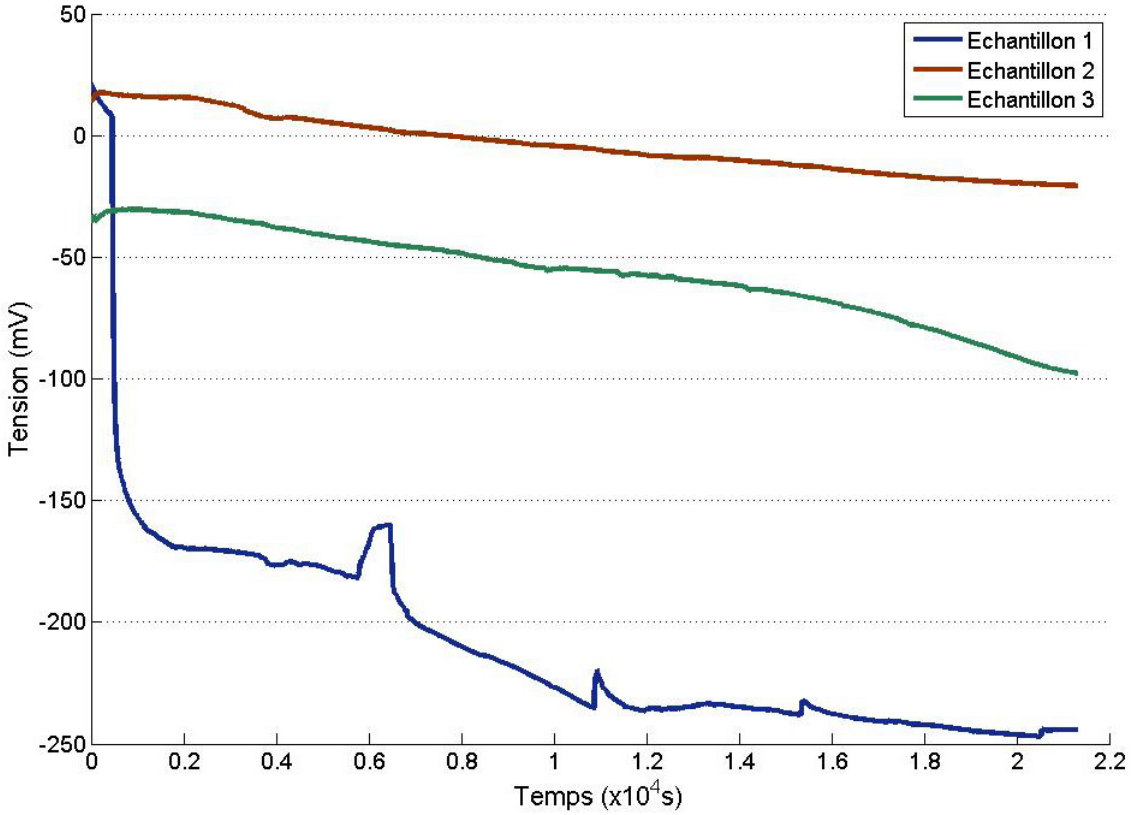



FIGURE E.3 – Evolution de la tension aux bornes du périoste au cours du temps (cathode côté muscle) pour trois échantillons de périoste fémoral ovin ayant subi une congélation de 24 heures minimum.

Cette fois, les courbes obtenues sont décroissantes et présentent rapidement une pente assez faible. En revanche, il est difficile d'expliquer la différence observée entre la pente au démarrage de la courbe bleue (qui correspond au premier échantillon testé) et celles des courbes verte et rouge. Néanmoins, on peut constater que le comportement bidirectionnel du périoste semble avoir disparu. La congélation préalable des fémurs semble donc avoir endommagé la structure responsable de cette propriété particulière. Il pourrait alors être intéressant d'étudier, à l'aide de techniques d'imagerie, les possibles modifications de la microstructure engendrées par le cycle de congélation, pour identifier les structures susceptibles d'être impliquées dans le comportement directionnel du périoste.

## Résumé

L'objectif de ce travail de thèse est de dégager des méthodes et des outils permettant de mieux comprendre le rôle joué par les phénomènes de transport (cellulaire, hydraulique et chimique) dans la mise au point de stratégies thérapeutiques de réparation osseuse. Pour cela, nous avons choisi d'associer deux approches : la réalisation d'études expérimentales et la mise au point de modèles numériques. Nous avons ainsi pu, lors d'une première étude présentée dans le chapitre 2 de ce document, relier la perméabilité intrinsèque d'un milieu poreux, paramètre déterminant dans l'étude du transport de fluide en son sein, à la structure géométrique de ses pores. Nous avons également mis en évidence l'importance des interactions électrochimiques lors de la progression d'une solution ionique (telle que les fluides physiologiques) à travers le tissu osseux, en raison de la structure poreuse et de la composition chimique (présence de fibres de collagènes chargées par exemple) de ce dernier. Ces outils ont ensuite permis d'analyser, en première approche, les résultats expérimentaux obtenus lors de la réalisation de tests de perméabilité sur des échantillons de périoste fémoral ovin, dans le but d'identifier les phénomènes physico-chimiques à l'origine du comportement particulier de cette membrane (chapitre 5). Nous nous sommes par ailleurs intéressés au développement d'implants osseux associant un substrat minéral biocompatible et des cellules souches mésenchymateuses, afin de favoriser une reconstruction tissulaire en volume des lésions de grande taille. Nous avons ainsi pu mettre en place, dans le chapitre 3, un dispositif expérimental permettant de réaliser de manière reproductible un test d'ensemencement cellulaire et d'évaluer le nombre, la répartition et le taux de viabilité des cellules greffées sur le biomatériau utilisé. A partir des résultats expérimentaux issus des tests d'ensemencement cellulaire, nous avons ensuite développé un modèle numérique dans le chapitre 4, pour dégager un ensemble de critères à respecter dans l'élaboration d'un substitut osseux qui favoriserait un développement tissulaire homogène contrôlé lors des premières étapes de la culture *in vitro* de ce type d'implants.


**Mots-clés : biomécanique, génie tissulaire osseux, cellules souches mésenchymateuses, périoste, phénomènes multiphysiques, modélisation, simulation, transport, bioréacteur**



## Abstract

This study aims to set up methods and tools to improve our understanding of the role played by transport phenomena (transport of cells, fluid and chemical species) in the development of new therapeutic protocols for bone reconstruction, using a double approach : experimental studies and numerical simulations. Hence, in the second chapter of this document, we have been able to link the intrinsic permeability of a porous medium – a key parameter regarding fluid transport through porous media – to the geometric structure of its pores. We have also highlighted the influence of electrochemical interactions on the flow of an ionic solution (such as physiologic fluids) through cortical bone, due to its porous structure and its chemical composition (presence of electrically charged fibers). These tools have then enabled us to analyze, at first glance, the experimental results of permeability tests conducted on ovin femoral periosteum, to identify the chemical-physical phenomena responsible for the specific behavior of this membrane (chapter 5). We also focused on the development of large bone implants coupling a mineral substitute and mesenchymal stem cells to enhance a volumic reconstruction of critical-sized bone defects. We have therefore designed, in chapter 3, a custom experimental set up that allows one to perform a reproducible cell seeding test on a porous scaffold and quantify the number of seeded cells as well as their viability rate. The experimental results provided by these tests have then initiated the numerical model exposed in chapter 4, that aims to highlight criteria to meet regarding the design of new bone substitutes that would enhance a homogeneous volumic tissue growth during the first stages of the *in vitro* development of coupled implants.


**Keywords : biomechanics, multiscale modeling, multiphysics phenomena, osteocyte, bone interstitial fluid, hydro-chemo-electrical coupling**