HAL
open science

Hydrogel poreux pour la reconstruction osseuse : élaboration, caractérisation et mise en œuvre dans un bioréacteur à perfusion

Jérôme Grenier

To cite this version:

Jérôme Grenier. Hydrogel poreux pour la reconstruction osseuse : élaboration, caractérisation et mise en œuvre dans un bioréacteur à perfusion. Génie des procédés. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLC091 . tel-02638200

HAL Id: tel-02638200

https://theses.hal.science/tel-02638200v1

Submitted on 28 May 2020

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-SACLAY

CentraleSupélec

NNT : 2019 SACLC 091

Hydrogel poreux pour la reconstruction osseuse : élaboration, caractérisation et mise en œuvre dans un bioréacteur à perfusion

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à CentraleSupélec

École doctorale n° 579 : sciences mécaniques et énergétiques, matériaux et géosciences (SMEMaG)
Spécialité de doctorat: Génie des Procédés

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 28 novembre 2019, par

Jérôme Grenier

Composition du Jury :

M. Christophe Egles, Professeur Université Technologique de Compiègne, (UMR 7338, BMBI)	Président du jury
M. Sylvain Deville, Directeur de recherche CNRS (UMR 3080, Saint-Gobain)	Rapporteur
M. Luc Picton, Professeur Université de Rouen (UMR 6270, PBS)	Rapporteur
Mme. Caroline Gentric, Professeure Université de Nantes (UMR 6144, GEPEA)	Examinatrice
M. Paul Menut, Professeur Université Paris-Saclay (AgroParisTech, UMR GENIAL)	Examinateur
M. Hervé Duval, Professeur Université Paris-Saclay (CentraleSupélec, EA 4038, LGPM)	Directeur de thèse
M. Bertrand David, Chargé de recherche CNRS (CentraleSupélec, UMR 8579, MSSMat)	Co-Directeur de thèse
M. Didier Letourneur, Directeur de recherche Université de Paris (Inserm, UMRS 1148, LVTS, Hôpital Bichat)	Co-Directeur de thèse

Thèse de doctorat

Titre : Hydrogel poreux pour la reconstruction osseuse : élaboration, caractérisation et mise en œuvre dans un bioréacteur à perfusion.

Mots clés : Ingénierie tissulaire osseuse, Hydrogel de polysaccharide, Germination, Lyophilisation, Culture cellulaire 3D, Bioréacteur, Transport d'oxygène, Lattice Boltzmann

Résumé : La reconstruction de larges défauts osseux nécessite l'implantation de matrices jouant le rôle d'échafaudage, biocompatibles, biodégradables et capables de promouvoir la régénération osseuse. Cette thèse porte sur un biomatériau poreux dont certaines formulations ont déjà démontré leur potentiel de régénération osseuse chez le rat et la chèvre. Il est obtenu par lyophilisation d'un hydrogel de polysaccharides (pullulane et dextrane) réticulé chimiquement.

Dans un premier temps, on s'intéresse à l'influence des paramètres du procédé d'élaboration sur la structure poreuse du biomatériau. Les matrices sont caractérisées à chaque étape du procédé : par rhéométrie en mode dynamique lors de la réticulation, par cryomicroscopie électronique à l'issue de la congélation, par microtomographie à rayon X à l'état déshydraté et enfin par microscopie confocale à l'état solvaté. Il apparaît que la structure poreuse obtenue à l'issue de la lyophilisation dépend fortement de la microstructure de la glace formée lors de l'étape de congélation : chaque pore résulte de la croissance d'un à quelques cristaux. Le nombre et la taille des grains de glace après solidification complète sont étroitement liés à la germination secondaire, un phénomène qui est exacerbé par la présence du réseau polymère.

Deux paramètres d'élaboration contrôlant la structure poreuse sont particulièrement examinés : d'une part la quantité de réticulant introduit lors de la synthèse de l'hydrogel (qui modifie la longueur de corrélation du réseau polymère), d'autre part la température de germination lors de la congélation. Après sublimation de la glace, le biomatériau obtenu est extrêmement poreux ($92 - 94\%$).

L'efficacité d'ensemencement des matrices déshydratées est quantifié à l'aide de suspensions de microsphères de différents diamètres et de suspensions de cellules : le seuil de coupure est de l'ordre du diamètre moyen des pores secs. Après hydratation (concomitante à l'ensemencement), la porosité est nettement plus faible ($\sim 30\%$) et le diamètre moyen des pores hydratés diminue d'un facteur 2 à 4 en fonction de la densité de réticulation.

Dans un second temps, cette thèse met en place une démarche d'étude in vitro portant sur les interactions des cellules osseuses (ostéoblastes de souris) avec le biomatériau. L'objectif est de disposer d'un système d'étude mimant les conditions physiologiques afin d'optimiser les propriétés de régénération osseuse du biomatériau. Le choix d'un dispositif in vitro permet de faire l'économie d'expérimentations animales. Un bioréacteur à perfusion est choisi comme modèle d'étude car il permet un environnement 3D où les transferts de matière peuvent être contrôlés. Une caractérisation multi-échelle est mise en place : marquage biologique et microscopie confocale à l'échelle des amas cellulaires et des matrices, imagerie par résonnance magnétique à l'échelle du bioréacteur. Celle-ci est complétée par la simulation numérique de l'hydrodynamique et du transport d'oxygène dissous dans le bioréacteur où chaque phase (fluide, hydrogel, amas cellulaires) est décrite avec une résolution spatiale de 55 µm correspondant à celle de l'IRM. Les équations de Navier-Stokes et l'équation de convection-diffusion sont simulées à l'aide de méthodes de Boltzmann sur réseau, particulièrement adaptées aux géométries complexes. On étudie l'influence de la taille des amas cellulaires et de la densité d'amas sur le champ de concentration d'oxygène en vue d'optimiser leur viabilité.

Cette thèse donne des éléments clés pour contrôler la microstructure d'un hydrogel poreux destiné à l'ingénierie tissulaire et fournit un protocole expérimental d'étude en bioréacteur à perfusion couplé à une modélisation numérique pour optimiser les propriétés d'usage du biomatériau.

Title: Porous hydrogel scaffolds for bone repair: fabrication, characterization and validation in a perfusion bioreactor.

Keywords: Bone Tissue Engineering, Polysaccharide-based Hydrogel, Nucleation, Freeze-drying, 3D Cell Culture, Bioreactor, Transport of Oxygen, Lattice Boltzmann Methods

Abstract: The reconstruction of large bone defects requires the implantation of scaffolds that are biocompatible, biodegradable and able to promote bone healing. This thesis focused on a porous biomaterial that had already demonstrated its osteo-inductive properties after implantation in rats and goats. This biomaterial is produced by freeze-drying of a chemically crosslinked polysaccharide-based (pullulan and dextran) hydrogel.

First, we studied the influence of the process parameters on the properties of the biomaterial porous structure. The scaffolds were characterized at each step of the fabrication process: by dynamic rheometry during crosslinking, by electron cryo-microscopy just after freezing, by X-ray microtomography in the dry state and finally by confocal microscopy in the swollen state. It appears that the porous structure obtained at the end of freeze-drying strongly depends on the microstructure of the ice formed during the freezing stage: each pore results from the growth of one to a few crystals. Ice grains are mostly generated by secondary nucleation, this phenomenon is enhanced by the presence of the polymer network. Two parameters controlling the porous structure were particularly examined: the amount of crosslinker that reacts with the polysaccharides (which affects the correlation length of the polymer network), and the nucleation temperature at the onset of freezing. After sublimation of ice, the biomaterial becomes highly porous (92-94%).

The seeding efficiency of the dried scaffolds was quantified using suspensions of narrow-sized calibrated microspheres and suspensions of cells: the seeding threshold is in the order of the average diameter of the dry pores. After swelling (occurring simultaneously with seeding), porosity is significantly lower (~ 30%) and the average diameter of the swollen pores is 2 to 4 times lower than in the dry state (depending on the crosslink density).

Secondly, we investigated in vitro the interactions between the porous hydrogel scaffolds and osteo-competent cells derived from a mouse cell line. The experimental device was designed in order to mimic the physiological conditions. A perfused bioreactor was chosen because of its ability to generate a 3D environment with controlled shear stress and controlled solute concentration. Such a system should help to optimize the biomaterial while reducing the use of animal experiments. A multi-scale characterization of the bioreactor tests was implemented: use of biomarkers and confocal microscopy at the spheroid and scaffold scales, magnetic resonance imaging at the bioreactor scale. We also investigated the hydrodynamics and the transport of oxygen within the bioreactor using computational fluid dynamics: fluid, hydrogel and spheroids were described at the MRI spatial resolution (i.e. 55 µm), Navier-Stokes equations and advection-diffusion equation were simulated using lattice-Boltzmann methods. These methods are indeed particularly suitable for complex geometries. The influence of organoid size and density on the oxygen concentration field was studied to optimize cell viability.

This thesis provides key elements to control the microstructure of the porous hydrogel scaffolds and proposes a workflow to optimize the bone healing properties of the biomaterial by coupling tests in perfused bioreactors, experimental characterizations and numerical modelling.

Remerciements

Je remercie les financeurs de cette thèse, l'IDEX Paris-Saclay à travers la bourse doctorale d'initiative interdisciplinaire (IDI 2016) et le Labex LaSIPS pour les frais de recherche.

Je remercie Benoit Goyeau et Benoit Fiorina, directeurs de l'école doctorale SMEMaG pour le pôle fluide de m'avoir autorisé à mener durant cette thèse une formation complémentaire de M.B.A. au Collège des Ingénieurs.

Je remercie Patrick Perré, Damien Durville et Didier Letourneur, directeurs des laboratoires LGPM, MSSMat et LVTS qui m'ont accueilli dans leurs locaux et qui m'ont fourni les conditions de travail nécessaires à mes recherches.

Je remercie Hervé Duval, directeur de thèse, qui m'a étroitement accompagné avec compétence et curiosité lors de mon exploration de domaines scientifiques très différents : depuis la formation des nuages jusqu'aux pelotes de polymères. Les simulations numériques de cette thèse n'auraient pas abouti sans son aide et sa grande rigueur. Je remercie Bertrand David, co-directeur de thèse, pour m'avoir transmis son savoir et son expérience de culture cellulaire animale en bioréacteur. Je retiens particulièrement son investissement pour m'offrir les meilleures conditions de travail, malgré un déménagement de laboratoire conséquent, ainsi que son aide précieuse pour le maintien en vie des cellules tout au long de l'année. Je remercie Didier Letourneur, co-directeur de thèse, pour le partage de sa vision de la recherche, de son sens pratique, pour la justesse de ses décisions stratégiques et pour son exigence concernant tous les supports visuels de ma thèse.

Je remercie Sylvain Deville et Luc Picton, rapporteurs, pour l'analyse de ce manuscrit ainsi que tous les membres du jury, Caroline Gentric, Paul Menut et Christophe Egles, président du jury, qui ont eu à examiner mes travaux et les confronter à leur propre expérience.

Je remercie les scientifiques, ingénieurs et chercheurs avec qui j'ai pu collaborer et qui ont co-produit les résultats de cette thèse : Fabrice Barou de Géosciences Montpellier, Pin Lu du LGPM, Rachida Aïd-Launais du LVTS, Camille Le Guilcher du LVTS, Clément Journé du LVTS et Iwona Cicha de l'Université d'Erlangen.

Je remercie les techniciens et ingénieurs du LGPM et du MSMMat qui m'ont apporté conseils et expertises pour mes expériences ou qui ont participé à leurs conceptions et leurs réalisations : Cyril Breton, Thierry Martin, Sébastien Gauthier, Joël Casalinho, Nicolas Roubier, Thomas Reiss, Gilbert Le Gal et Philippe Lambert

Je remercie d'autres scientifiques expérimentés qui m'ont beaucoup apporté pour la mise au point d'expériences originales : Isabelle Bataille du LVTS, Marie-Noëlle Labour et Teresa Simon-Yarza du LVTS, Stéphanie Passot du LGPMA et Alexandre Tanguy du LMS.

Je remercie les scientifiques « en herbe », stagiaires ou doctorants du LVTS, LGPM et MSSMat avec qui j'ai pu échanger sur plusieurs sujets, et en particulier Soraya Lanouar, Claire Roussey et Arnaud Challansonnex pour leurs coups de main très appréciables ! Je remercie également tous le personnel de ces trois laboratoires avec qui j'ai eu le plaisir de partager ces trois années de thèse.

Je remercie les élèves ingénieurs Louis P., Joris M., Valentin M., les élèves de masters Clément C. et Christo A. A., ainsi que Laëtitia O. que j'ai eu la chance d'encadrer.

Je remercie chaleureusement mes anciens encadrants du Parcours Recherche : Filipa Lopes, Olivier Bernard et Hubert Bonnefond qui m'ont donné l'envie de poursuivre ma formation par une thèse.

Pour finir, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille et leurs encouragements durant toutes ces années.

Préambule

Le manuscrit est construit à partir de trois articles qui constituent les trois chapitres de résultats de cette thèse.

Grenier, J., Duval, H., Barou, F., Lv, P., David, B., & Letourneur, D. (2019). Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying. *Acta biomaterialia*. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.070

Grenier, J., Duval, H., Lv, P., Barou, F., Aïd-Launias, R., Le Guilcher, C., David, B., & Letourneur, D. Control of Pore Size in Hydrogel Scaffolds: Effects of Crosslinking and Nucleation during Freeze-Drying.
(En préparation)

Grenier, J., Duval, H., Journé, C., Cicha, I., David, B., & Letourneur, D. Culture of MC3T3E1 organoids within polysaccharide-based hydrogel scaffolds: experimental and numerical study at the bioreactor scale.
(En préparation)

Les travaux de cette thèse ont fait l'objet de quatre communications orales en anglais lors de conférences sous la forme d'un poster et de trois présentations.

J. Grenier, H. Duval, F. Barou, P. Lv, B. David, D. Letourneur. Mechanisms controlling the porous structure of freeze-dried hydrogel scaffolds
3rd BIOMAT Congress Materials for Health 2019, Jun 2019, La Grande Motte, France

J. Grenier, H. Duval, F. Barou, P. Lu, D. Letourneur, B. David. Pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying
MATERIAUX 2018, Nov 2018, Strasbourg, France

J. Grenier, B. David, H. Duval, D. Letourneur. In vitro cellularized porous hydrogel scaffolds with flow perfusion for bone defect reconstruction.
29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials, Sep 2018, Maastricht, Netherlands

J. Grenier, B. David, H. Duval, D. Letourneur. Under flow perfused porous hydrogel scaffolds: an in vitro model of bone defect
2rd BIOMAT Congress Materials for Health 2017, Jun 2017, Ambleuteuse, France

Introduction Générale

Le tissu osseux se régénère continuellement par les actions opposées et coordonnées des cellules ostéoblastes, responsables de la production de la substance osseuse et de leurs antagonistes, les ostéoclastes, qui digèrent cette substance osseuse. Il en résulte un équilibre dynamique appelé remodelage osseux, qui maintient l'intégrité de notre squelette. En cas de fracture, l'équilibre est déplacé en faveur des ostéoblastes qui régénèrent la substance osseuse. De leur côté, les ostéoclastes conservent leur action de destruction de sorte à parvenir au remodelage de la substance nouvellement formée. Ce mécanisme atteint ses limites lors d'un manque trop important de substance osseuse, on parle alors d'un défaut osseux de taille critique dont le comblement ne peut se faire spontanément. Ces défauts osseux peuvent survenir suite à de violents traumatismes par accident ou volontairement suite à une opération chirurgicale pour traiter une tumeur osseuse, une infection, une malformation ou lors de la fixation d'une prothèse sur un os sain.

Le traitement thérapeutique chirurgical de référence (le « gold standard ») consiste à remplir le défaut osseux par de la substance osseuse directement prélevée sur une zone saine du patient, il s'agit d'une greffe autologue. Malheureusement, certains patients n'ont pas accès à ce traitement car ils sont trop affaiblis pour tolérer cette double opération chirurgicale ou possèdent un stock osseux insuffisant. D'autres solutions thérapeutiques sont alors nécessaires. Les substituts osseux les plus utilisés sont d'origine naturelle et proviennent d'os cadavériques de donneurs humains ou d'origine bovine, après nettoyage des cellules et des résidus organiques. Cependant, leur utilisation comporte des risques d'inflammation au site d'implantation pouvant aboutir à des douleurs chroniques chez les patients. Le greffon peut même être rejeté conduisant à l'échec de la greffe.

La problématique scientifique soulevée par ce contexte clinique est de proposer de nouveaux matériaux pour favoriser la réparation osseuse.

Il s'agit d'une problématique interdisciplinaire appelée ingénierie tissulaire osseuse qui consiste en un dialogue entre les sciences des matériaux et la biologie de la régénération osseuse. Cette problématique inclut également la faisabilité industrielle de la production des biomatériaux et les aspects de réglementation de leur mise sur le marché. Ces contraintes sont de plus en plus considérées en amont des recherches.

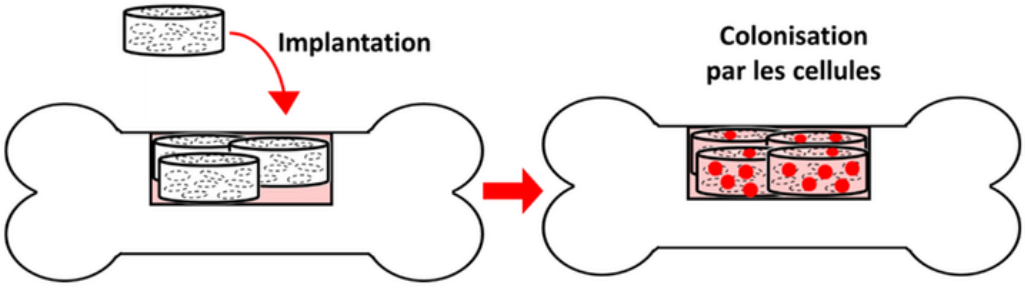
Cette thèse se concentre sur un biomatériau fabriqué à partir d'un hydrogel. Les hydrogels sont des polymères qui peuvent contenir plus de 10 fois leur poids en eau. La nature des polymères peut être choisie pour favoriser la biocompatibilité des hydrogels, c'est-à-dire leur tolérance par l'organisme receveur. Le Chapitre I consacré à la revue bibliographique décrit en particulier le positionnement des hydrogels parmi les substituts osseux.

L'hydrogel utilisé dans ce projet est issu de deux polysaccharides naturels : le pullulane et le dextrane, qui sont biocompatibles et biodégradables. Ces ingrédients sont déjà utilisés en grande quantité dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, ce qui facilite leur parcours de certifications réglementaires pour leurs utilisations en clinique. Le Chapitre II dédié aux matériels et aux méthodes présentera plus en détails les composés chimiques et le protocole d'élaboration.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer et d'améliorer les propriétés de l'hydrogel en vue de son application en ingénierie tissulaire osseuse.

Les propriétés de l'hydrogel dépendent de sa formulation et de sa mise en forme. Son élaboration consiste en la réticulation chimique des polysaccharides pour former un réseau de polymères. Une structure poreuse est ensuite obtenue par lyophilisation de l'hydrogel. La compréhension des mécanismes de cette mise en forme fait l'objet du Chapitre III de cette thèse. Deux paramètres clés contrôlent la structure poreuse: la quantité d'agent réticulant et la température de germination lors de la phase de congélation. Ils sont étudiés plus en détails dans le Chapitre IV.

Les pores obtenus dans l'hydrogel déshydraté sont conservés lors du gonflement de l'hydrogel après implantation in vivo (chez l'animal). Ces pores sont colonisés par les cellules de l'hôte qui vont pouvoir initier la formation osseuse et vont finir par dégrader l'hydrogel. Dans ce scénario thérapeutique, le patient est l'acteur de sa guérison, c'est ce que l'on appelle la médecine régénératrice. Ici, le matériau diffère d'une prothèse dans le sens où il favorise la régénération du tissu osseux plutôt que de le remplacer.



Implantation du substitut osseux (disques d'hydrogel poreux) dans un défaut osseux de taille critique où les cellules du patient colonisent les pores du biomatériau.
Jérôme Grenier, The Conversation. https://theconversation.com/une-nouvelle-piste-pour-guerir-les-fractures-119337

Pour comprendre l'influence de la structure poreuse de l'hydrogel, il est nécessaire d'évaluer les interactions entre les cellules et l'hydrogel poreux. Pour cela, on peut différencier trois niveaux d'évaluation : 1) l'étude *in vitro* avec des cellules en laboratoire, 2) l'étude *in vivo* chez l'animal, 3) l'étude clinique chez l'homme. Plus le niveau augmente, plus les coûts augmentent (éthiques, financiers, matériels, ressources humaines). Dans cette thèse l'étude *in vitro* est abordée. L'enjeu est de réduire le nombre d'essais effectués aux niveaux supérieurs

(*in vivo* et clinique) en optimisant en amont l'hydrogel. Le défi principal est d'établir des conditions artificielles en laboratoire qui soient pertinentes (physiologiques) afin d'anticiper au mieux les conditions naturelles de réparation.

Les études in vitro de cette thèse sont effectuées dans un bioréacteur à perfusion

Les bioréacteurs à perfusion permettent de créer un environnement 3D qui mime les conditions physiologiques, grâce à un apport de nutriment et à des sollicitations mécaniques contrôlées par l'écoulement du milieu nutritif. En pratique, des cellules osseuses de souris sont ensemencées dans les hydrogels poreux qui sont ensuite empilés dans le bioréacteur. Le développement des cellules contenues dans l'hydrogel dépend de leur environnement physico-chimique. Celui-ci peut être décrit par des simulations numériques qui résolvent les équations de la mécanique des fluides.

L'objectif est de proposer un pilotage optimal du bioréacteur pour favoriser le développement des cellules vers la production de substance osseuse, en confrontant des analyses biologiques opérées sur les cellules avec les simulations numériques.

Plan du manuscrit

Dans le premier chapitre, la revue bibliographique s'intéresse aux différents matériaux candidats pour la reconstruction osseuse, en particulier les hydrogels. Puis les différents systèmes d'étude de la reconstruction osseuse *in vitro* sont exposés et l'intérêt des bioréacteurs à perfusion est justifié. Enfin, les méthodes de résolution des équations de la mécanique de fluides au sein d'un bioréacteur à perfusion sont abordées.

Le deuxième chapitre présente les méthodes expérimentales et numériques utilisées.

Les résultats de cette thèse sont présentés en trois chapitres. D'abord, le Chapitre III décrit les mécanismes de formation des pores dans l'hydrogel lors de la lyophilisation. Le Chapitre IV propose deux paramètres de contrôle de la taille des pores dans l'hydrogel. Enfin, le Chapitre V développe la mise en place d'une culture contrôlée de cellules dans les pores de l'hydrogel au sein d'un bioréacteur à perfusion caractérisé en écoulement.

La conclusion générale justifie des propositions de poursuites d'études à partir des résultats exposés dans cette thèse.

Sommaire

Remerciements *1*

Préambule *3*

Introduction Générale *4*

Chapitre I Bibliographie *11*

1. Biomatériaux pour la régénération osseuse **12**
1.1 Description biologique l'os 12
1.2 Mécanismes de la régénération d'un défaut osseux 13
1.3 Les biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuses 14
1.3.1 Les différentes greffes de tissus osseux 14
1.3.2 Spécifications du cahier des charges des substituts osseux 15
1.3.3 Classification des substituts osseux 16
1.4 Les hydrogels pour l'ingénierie tissulaire osseuse 16
1.4.1 Nature des polymères constituants les matrices d'hydrogel 17
1.4.2 Méthodes pour la mise en forme des matrices poreuses d'hydrogel 17
1.4.3 Production d'une matrice poreuse d'hydrogel par « ice-templating » 18
1.4.4 Une matrice poreuse d'hydrogel de polysaccharides conçue pour l'ingénierie tissulaire osseuse 18

2. Modèles expérimentaux d'études in vitro de la régénération osseuse **20**
2.1 Le choix des cellules pour les études des biomatériaux *in vitro* 20
2.2 La pertinence des modèles *in vitro* en 3D 21
2.3 Les bioréacteurs à perfusion pour l'ingénierie tissulaire osseuse 23
2.3.1 Différents designs de bioréacteurs avec écoulement 23
2.3.2 Modélisations d'un bioréacteur à perfusion 24

Chapitre II Matériels et Méthodes – Une approche multi-échelle et pluridisciplinaire. *27*

1. Fabrication d'un biomatériau poreux pour la culture cellulaire en trois dimensions **28**
1.1 Préparation de la solution aqueuse de polysaccharides 28
1.2 Réticulation chimique des polysaccharides pour former un hydrogel 28
1.3 Mise en forme et rinçages des matrices d'hydrogel 30
1.4 Elaboration de matrices d'hydrogel poreuses par lyophilisation. 31

2. Étude des étapes du procédé de fabrication de l'hydrogel poreux **33**
2.1 Étude des propriétés mécanique de l'hydrogel avant lyophilisation par rhéologie 33
2.1.1 Étude de la réticulation de la solution de polysaccharides 33
2.1.2 Caractérisations des propriétés du réseau réticulé de l'hydrogel 35
2.1.3 Détermination de la quantité de réticulant greffé sur les chaînes de polymère 38
2.2 Étude de la congélation des matrices d'hydrogel 39
2.2.1 Dispersion des degrés de surfusion lors de congélation des matrices d'hydrogel 39
2.2.2 Contrôle du degré de surfusion des matrices d'hydrogel 40
2.2.3 Caractérisations par cryo-microcopie électronique à – 100°C des matrices d'hydrogel solidifiées 41

3. Caractérisations des matrices d'hydrogel poreuses après lyophilisation **44**
3.1 Caractérisations de la porosité des matrices déshydratées 44
3.1.1 Observations qualitatives de la porosité par microscopie électronique à balayage 44
3.1.2 Analyse quantitative complète de la porosité par tomographie à rayon X 44
3.2 Caractérisations de la porosité des matrices hydratées 45
3.2.1 Détermination de la porosité par mesures de gonflement 45
3.2.2 Analyse quantitative de la porosité par imagerie microscopique confocale 45

3.2.3 Détermination de l'effet de filtre dû à la porosité lors de l'ensemencement de microsphères synthétiques. 45

4. Étude in-vitro des matrices d'hydrogel poreuses en environnement biologique 3D dans un bioréacteur à perfusion 47

4.1 Culture d'une lignée cellulaire animale issue de la souris 47
4.1.1 Produits chimiques et biologiques pour la culture cellulaire 47
4.1.2 Lignée cellulaire de pré-ostéoblastes MC3T3-E1 47
4.1.3 Conditions standards de culture 48
4.1.4 Contrôle de l'état de confluence des cellules 49
4.1.5 Entretien de cellules MC3T-E1 en phase exponentielle de croissance 49
4.1.6 Préservation par cryogénie des cellules MC3T3-E1 50
4.2 Ensemencement des matrices poreuses avec des cellules ostéoblastes de souris 50
4.3 Perfusion des matrices cellularisées dans un bioréacteur à perfusion 51
4.4 Evaluation de la prolifération des cellules dans les matrices perfusées 52

5. Modélisation des conditions hydrodynamiques et nutritives des cellules dans les matrices d'hydrogel perfusées en bioréacteur 56

5.1 Modélisation de l'écoulement hydrodynamique dans la macroporosité du bioréacteur 56
5.1.1 Acquisition de la macroporosité du bioréacteur par IRM 56
5.1.2 Simulation de l'écoulement hydrodynamique dans le bioréacteur par Méthode de Boltzmann sur Réseau 57
5.2 Modélisation de l'état stationnaire de concentration en nutriment dans le bioréacteur 58
5.2.1 Mesure du coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel 59
5.2.2 Description de la phase cellulaire dans les matrices d'hydrogel perfusées 62
5.2.3 Simulation de l'état stationnaire de concentration en oxygène dans le bioréacteur par Méthode de Boltzmann sur Réseau 63

Chapitre III Résultats – 1ère Partie Mécanismes de formation des pores lors de la lyophilisation d'un hydrogel réticulé 68

Préambule 69

1. Introduction 72

2. Materials and methods 74

2.1 Polysaccharides 74
2.2 Hydrogel formulation 74
2.3 Swelling experiments 74
2.4 Rheological measurements and mesh size 75
2.5 Freeze-drying process 76
2.6 Dedicated nucleation experiments 77
2.7 Scanning electron microscopy of frozen scaffolds 78
2.8 Porous structure analyses of freeze-dried scaffolds 78
2.9 Cell seeding in freeze-dried hydrogel scaffold 79
2.10 Statistical methods 79

3. Results 80

3.1 Cross-linking and subsequent mesh size of the polysaccharide-based hydrogel 80
3.2 Nucleation of ice from supercooled hydrogel 80
3.3 Polycrystalline structure of the frozen hydrogel scaffolds 82
3.4 3D porous structure of freeze-dried scaffold 83
3.5 Hydrogel porous structure after swelling 84
3.6 Cell seeding demonstrates interconnectivity of pores 85

4. Discussion 86

5. Conclusions 87

6. Annexes : solidification de l'hydrogel de polysaccharides réticulés en surfusion 89
6.1 Estimation des vitesses de front de solidification 89
6.2 Observation microscopique de la cinétique de solidification 90
6.3 Observation au microscope en lumière blanche de l'hydrogel solidifié 92

Chapitre IV Résultats – 2ème Partie Contrôle de la taille des pores dans une matrice d'hydrogel : effets du réticulant et de la température de germination lors de la lyophilisation 93

Préambule 94

1. Introduction 97

2. Materials and methods 98
2.1 Polysaccharide-based hydrogel scaffolds 98
2.1.1 Polymer solutions 98
2.1.2 Hydrogel preparations with different crosslinking feeding ratios 98
2.1.3 Hydrogel characterizations 98
2.2 Porous scaffolds texturation by freeze-drying 99
2.3 Scanning electron microcopy of the frozen hydrogel scaffolds 99
2.4 Porous structure of freeze-dried hydrogel scaffolds 100
The porosity of the freeze-dried scaffolds was acquired with a voxel size of (6 µm)^3 on a X-ray nanotomograph EasyTom XL 150/160 from RX- 100
2.5 Synthetic microspheres seeding in porous scaffolds 100
2.6 Cell seeding in porous scaffolds 100

3. Results 102
3.1 Crosslinking of the polysaccharide-based hydrogel. 102
3.2 Freeze-drying of the crosslinked hydrogels. 105
3.3 Seeding capacity of freeze-dried scaffolds with synthetic microspheres. 109
3.4 Seeding capacity of freeze-dried scaffolds with isolated cells and cell spheroids. 110

4. Discussion 112

5. Conclusions 114

6. Appendices 115
6.1 Tan(δ) and the gelation point in the crosslinking process 115
6.2 Crosslinking kinetic dependence on the crosslinking feeding ratio 117
6.3 Number of phosphate diesters per crosslinked polymer chain 118

Chapitre 5 Résultats – 3ème Partie – Organoïdes de MC3T3E1 cultivés dans des hydrogels poreux de polysaccharides : études expérimentales et numériques dans un bioréacteur 119

Résumé 122

1. Introduction 123

2. Matériels et Méthodes 125
2.1 Synthèse des matrices poreuses d'hydrogel 125
2.2 Ensemencement des matrices poreuses d'hydrogel en MC3T3-E1 125
2.3 Culture 3D en conditions dynamiques dans un bioréacteur à perfusion 126
2.4 Caractérisations par microscopie confocale du nombre de cellules, de leur division et de leur viabilité 126
2.4.1 Nombre de cellules 126
2.4.2 Expression de Ki67 127
2.4.3 Viabilité/Mortalité 127

2.5 Acquisitions IRM 128
2.5.1 Marquage avec des nanoparticules de fer 128
2.5.2 Séquences IRM 128
2.6 Mesure du coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel 129
2.6.1 Description du dispositif 129
2.6.2 Protocole de mesure 129
2.6.3 Calcul du coefficient de diffusion 130
2.7 Simulation de l'écoulement dans le bioréacteur à perfusion 131
2.8 Simulation du transport d'oxygène dans l'hydrogel 132
2.8.1 Modèle et données d'entrée 132
2.8.2 La méthode de Boltzmann sur réseau 133
2.8.3 Définition des cas simulés 136

3. Résultats 137
3.1 Culture 3D en conditions dynamiques vs conditions statiques 137
3.1.1 Évaluation du nombre de cellules 137
3.1.2 Évaluation de la capacité de division des cellules 137
3.1.3 Évaluation de la viabilité des cellules 137
3.2 Estimation par IRM du nombre de cellules cultivées dans les matrices poreuses 141
3.2.1 Relaxométrie T_2^*-MSME 141
3.2.2 Séquence T2-turbo-RARE 141
3.3 Mesure du coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel 143
3.4 Construction d'un bioréacteur numérique à partir d'acquisitions IRM 143
3.5 Simulations numériques de l'écoulement et du transport d'oxygène par la méthode de Boltzmann sur réseau 145
3.5.1 Description de l'écoulement à travers l'empilement de matrices acquis par IRM 145
3.5.2 Influence de la taille et du nombre d'amas sur la consommation d'oxygène dans l'hydrogel 145
3.5.3 Transport d'oxygène dans un bioréacteur à perfusion 148

4. Discussions 150
4.1 Intérêt de la culture 3D en conditions dynamiques 150
4.2 Modélisation d'un bioréacteur à perfusion fondée sur des mesures expérimentales 151
4.2.1 Les enjeux de l'acquisition 3D des différentes échelles de porosité 151
4.2.2 Simulation de l'écoulement et du transport d'oxygène dissous 153
4.2.3 Apports des simulations numériques à la conduite du bioréacteur 154

5. Conclusions 155

6. Annexes 156
6.1 Acquisition par IRM de la microporosité d'une matrice d'hydrogel 156
6.2 Transport et consommation d'oxygène dans un bioréacteur annulaire simplifié 156

Conclusion Générale 159

Bibliographie 162

Chapitre I

Bibliographie

1. Biomatériaux pour la régénération osseuse

1.1 Description biologique l'os

Le squelette est un organe constitué de différents tissus spécialisés dont le tissu osseux. Les fonctions assurées par les os sont variées. Elles sont d'ordre mécanique, pour le maintien de la posture du corps, la mobilité des membres grâce à l'action des muscles, la transmission du son jusqu'à l'oreille interne et enfin la protection des organes internes. Elles sont d'ordre biologique pour le stockage et la régulation de minéraux, principalement le calcium (Clarke, 2008), et pour l'hématopoïèse, c'est-à-dire la production de cellules par la moelle osseuse.

1) Le tissu osseux

Le tissu osseux est le tissu conjonctif (ou tissue de maintien) le plus rigide de notre corps. C'est un matériau composite comportant une phase organique et une phase minérale. La phase organique se présente sous la forme de fibres constituées de protéines, de collagène de type I et de glycosaminoglycanes ; la phase minérale est constituée principalement de cristaux d'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Le tissu osseux est organisé en deux géométries distinctes qui forment l'os cortical et l'os trabéculaire (**Figure 1**). L'os cortical constitue la périphérie des os ; il possède un module d'élasticité autour de 20 GPa (Zysset et al., 1999). La partie centrale de l'os est constitué du tissu osseux trabéculaire, dont le module d'élasticité moyen est de l'ordre de 10 GPa (mesuré par nano-indentation par Zysset et al. (1999)). La porosité de l'os cortical est de moins de 30%. Cette partie est responsable de la rigidité des os. La porosité de l'os trabéculaire est supérieure (entre 30% et 90%) et peut contenir de la moelle osseuse. L'os cortical est entouré du périoste, un tissu très vascularisé et innervé qui renferme des cellules progénitrices d'ostéoblastes, responsables de la croissance de l'os et de chondrocytes, responsables de la synthèse de cartilage.

2) La moelle osseuse

Les os longs (exemple, le fémur) et les os plats (exemple, la hanche) abritent la moelle osseuse La moelle osseuse est une substance riche en cellules souches, réparties en trois types. Les cellules souches mésenchymateuses sont capables de se différencier en cellules des tissus du squelette tel que le cartilage (chondrocytes), le tissu graisseux (adipocytes) et les os (ostéoblastes). Les cellules souches hématopoïétiques produisent les cellules sanguines dont les globules rouges (érythrocytes), les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes (thrombocytes). Enfin, les cellules souches endothéliales sont à l'origine des vaisseaux sanguins.

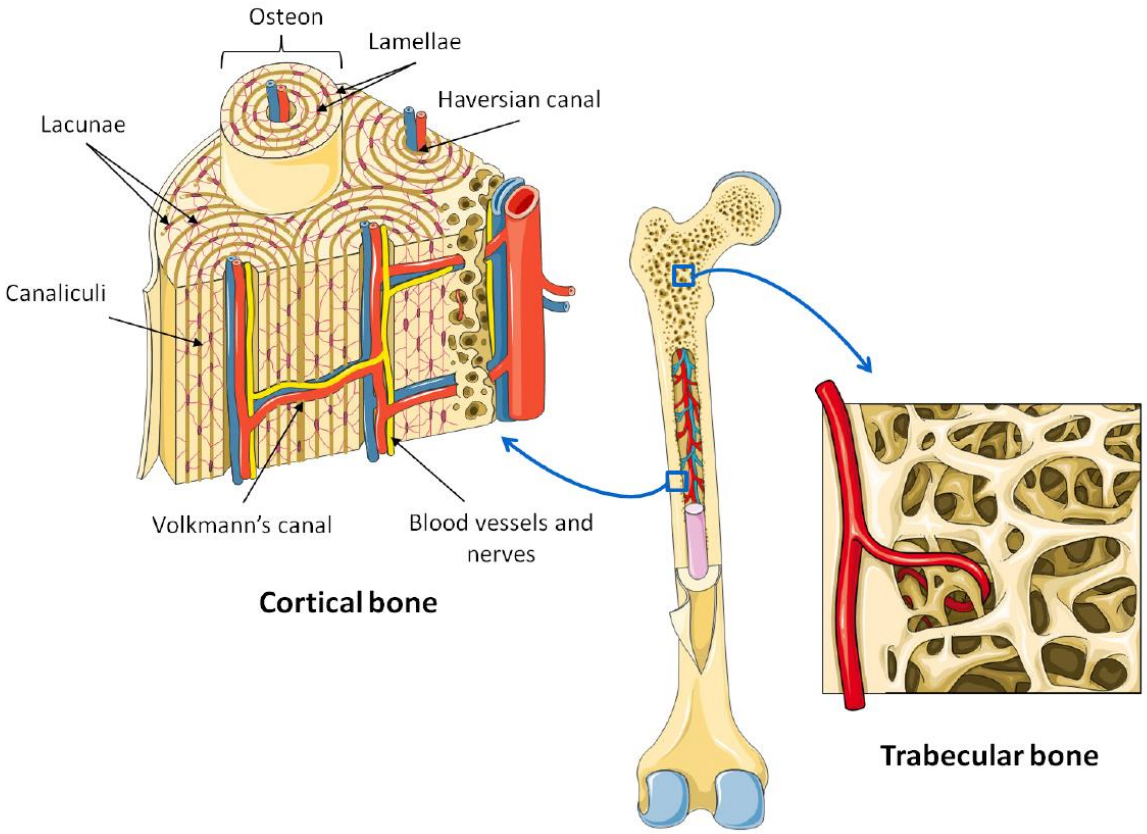


Figure 1 – Schéma de l'organisation de l'os cortical (à gauche) et de l'os trabéculaire (à droite) tiré de la thèse de Morgane Cabanon (2015). L'os cortical est composé d'unités cylindriques appelées ostéones qui sont vascularisées à travers le canal de Havers (dans l'axe des ostéones) et le canal de Volkmann (perpendiculaire à l'axe des ostéones). Les ostéones sont formés de lamelles concentriques qui renferment des lacunes interconnectées par les canalicules. L'os trabéculaire est un réseau de lamelles plus poreux (jusqu'à 90%) que l'os cortical (moins de 30%).

1.2 Mécanismes de la régénération d'un défaut osseux

La régénération du défaut osseux s'effectue en trois principales étapes : 1) l'inflammation, 2) la construction, 3) le remodelage (Czekanska, 2014).

1) L'inflammation, première étape dans la régénération

Lors d'une lésion osseuse traumatique sévère provoquant une perte importante de substance osseuse, une série d'évènement biologiques va aboutir à une inflammation locale. Elle est provoquée par la destruction des vaisseaux sanguins, conduisant à une hypoxie, à un manque de nutriment et à l'apparition d'une zone nécrotique (Sfeir et al., 2005). Cette inflammation entraine le recrutement et la multiplication de cellules souches provenant de la moelle osseuse ou du périoste (Taguchi et al., 2005). Ce déplacement de cellules est induit par des signaux chimiques (cytokines et facteurs de croissance) produits par les cellules du tissu conjonctif. On

parle de chimiotaxie (Kitaori et al., 2009). Cette phase inflammatoire primaire dure entre un et trois jours. Elle est suivie de la production d'un tissu granulaire en 15 jours.

2) La construction d'une matrice minéralisée

La destruction de l'os libère de nombreux facteurs de croissance dont les protéines de la famille des BMP (Bone Morphogenetic Proteins) (Yu et al., 2010). Ces facteurs stimulent la prolifération et la différentiation des cellules souches en fibroblastes et chondrocytes qui produisent de la matrice extracellulaire (ECM), un ensemble de polymères à base de protéines et saccharides tels que les collagènes et les glycosaminoglycanes. Cette matrice de fibres et de cartilage forme un cal mou (McKibbin, 1978) qui est minéralisé par les ostéoblastes en un cal dur (Probst and Spiegel, 1997). Cette phase dure en moyenne trois mois chez l'homme.

3) Le remodelage du cal dur

Après les trois mois de formation du cal dur, le remodelage est initié par les ostéoclastes qui résorbent le cal tandis que les ostéoblastes continuent la maturation de la matrice (Probst and Spiegel, 1997). L'os immature et non orienté devient un os lamellaire primaire multidirectionnel en 18 mois. Puis l'os lamellaire s'oriente dans la direction longitudinale et forme après deux ans l'os mature trabéculaire ou cortical (section 1.1). Le remodelage permet également la revascularisation interne du site osseux, ce qui marque la restauration finale du défaut osseux (Carano and Filvaroff, 2003).

1.3 Les biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuses

Lorsque les procédés naturels de régénération osseuse ne parviennent pas à combler et à reconstruire le défaut osseux, il est nécessaire d'apporter par chirurgie un biomatériau naturel ou synthétique. C'est le cas pour les défauts de taille critique, généralement de plus de 3 cm pour les os longs selon Calori et al. (2011). Dans l'idéal (Albrektsson and Johansson, 2001), les biomatériaux servant de substituts osseux doivent posséder trois propriétés fondamentales. Il s'agit de l'ostéoinduction, c'est-à-dire, la capacité à diriger la différenciation de cellules souches en cellules osseuses, de l'ostéoconduction, qui est le fait qu'un tissu osseux puisse se développer sur la surface du biomatériau et de l'ostéointégration qui se définit comme la création d'une jonction persistante avec l'os natif. Après plusieurs mois, dans le cas d'une régénération complète du défaut osseux, le biomatériau n'est plus décelable sur le site d'implantation, à la différence d'une prothèse.

1.3.1 Les différentes greffes de tissus osseux

1) L'autogreffe ou le « gold standard »

L'autogreffe (ou greffe autologue) est le traitement chirurgical de référence (« gold standard ») (Sen and Miclau, 2007), il s'agit de la greffe du propre tissu osseux du patient. La procédure consiste à prélever de l'os trabéculaire, principalement depuis la crête iliaque du patient, puis à implanter le greffon dans le défaut osseux. L'os trabéculaire est parfaitement ostéoinducteur, ostéconducteur et ostéointégrateur, d'où son statut de biomatériau de référence.

Cependant, la greffe autologue a ses limites (Calori et al., 2011; Sen and Miclau, 2007). Elle a un coût important, en partie à cause des complications qui peuvent survenir après la greffe, principalement les infections et les douleurs chroniques (St John et al., 2003). De plus, l'autogreffe n'est pas toujours réalisable du fait du stock limité d'os prélevable sur le patient, ainsi qu'une morbidité du site de prélèvement (Sen and Miclau, 2007). Enfin, les échecs conduisant à une ré-opération sont courants (entre 10% et 50% des greffes (Calori et al., 2011)). C'est pourquoi d'autres sources de greffons doivent être envisagées.

2) L'allogreffe et la xénogreffe

L'allogreffe et la xénogreffe consistent à greffer du tissu osseux prélevé sur des cadavres humains (allogreffe) ou animaux (xénogreffe). Elles peuvent s'envisager en complément ou en remplacement de l'autogreffe. Les espèces animales concernées peuvent être les grands mammifères (principalement les bovins) ou les animaux marins comme le corail ou la seiche. Le tissu osseux prélevé est préparé pour son implantation chez le patient à la suite d'une combinaison variable de plusieurs traitements : lyophilisation, déminéralisation, élimination des résidus organiques (cellules, lipides, protéines) et stérilisation. L'objectif est de réduire les risques de transmission de maladies et de limiter l'exacerbation de la réaction inflammatoire qui pourrait conduire au rejet du greffon. En plus de ces risques, le succès de la greffe fluctue d'un prélèvement à l'autre (Calori et al., 2011). Pour leur utilisation clinique, le besoin de standardisation des greffons a conduit à développer d'autres sources de substituts osseux à partir de matériaux dérivés du tissu osseux, de matériaux naturels, synthétiques ou mixtes.

1.3.2 Spécifications du cahier des charges des substituts osseux

D'après la revue de O'Brien (2011), les biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse doivent posséder 5 propriétés suivantes :

- Biocompatibilité : le biomatériau ne perturbe pas le comportement physiologique des cellules, il limite une inflammation excessive
- Biodégradabilité : la résorption du biomatériau par les cellules, idéalement au rythme où le nouveau tissu est formé
- Tenue mécanique : le biomatériau doit pouvoir être à minima manipulable est implantable. O'Brien (2011) met en garde contre l'idée de vouloir copier les propriétés mécaniques du tissue à renouveler car cela n'est pas nécessaire et, dans le cas du tissue osseux, cela s'accompagne généralement d'une baisse de la porosité et de la biodégradabilité.

- Structure poreuse : des pores sont nécessaires pour permettre l'invasion du biomatériaux par les cellules ce qui conditionne sa biodégradabilité (Loh et al., 2013). Les paramètres clés sont la taille des pores et leur interconnectivité.
- Production industrielle : la possibilité d'augmenter l'échelle de production depuis le laboratoire à l'installation industrielle avec un produit qui puisse obtenir les certificats de réglementations, par exemple GMP (Good Manufacturing Practise), dans le but d'aller jusqu'à la thérapie chez le patient.

1.3.3 Classification des substituts osseux

1) Les biomatériaux naturels

Des prélèvements de tissus osseux issus de cadavres animaux peuvent être transformés en biomatériaux après avoir subi des traitement physiques et chimiques (Aichelmann-Reidy and Yukna, 1998). C'est le cas de l'hydroxyapatite dit biologique obtenu après traitement à 300°C de résidus osseux (exemple : BIO-OSS®) ou du carbonate de calcium biologique extrait du corail (exemple : BIOCORAL®).

2) Les biomatériaux synthétiques

Les biomatériaux synthétiques sont de composition minérale, organique ou mixte (Aichelmann-Reidy and Yukna, 1998). Parmi les biomatériaux minéraux, on retrouve des céramiques de phosphate de calcium qui peuvent être de l'hydroxyapatite synthétique, du phosphate tricalcique ou des mélanges biphasiques de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite (exemple : CERAFORM®). Les bio-verres sont des dérivés de silices comportant des oxydes métalliques (exemple : BIOGLASS®). Le plâtre dit « de Paris » est un composé de sulfate de calcium (exemple : LIFECORE®). Pour finir, les biomatériaux constitués de polymères peuvent être produits à partir de dérivés pétrochimiques (polylmétacrylate de méthyle, PMMA ou l'alcool polyvinylique, PVA) ou naturels (collagènes et polysaccharides). La section suivante (section 1.4) développe plus en détails ces biomatériaux à base de polymères et d'eau que l'on nomme hydrogels.

1.4 Les hydrogels pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Les hydrogels sont des polymères hydrophiles capables de se gorger d'eau. Ils témoignent de multiples utilisations en pharmacie, par exemple pour la délivrance de médicaments (Peppas et al., 2000). Leur composition (polymères organiques et eau) est proche de la matrice extracellulaire des tissus biologiques. Ils sont aujourd'hui également étudiés et développés pour l'ingénierie tissulaire (Drury and Mooney, 2003). En particulier, les hydrogels présentent des propriétés qui intéressent l'ingénierie tissulaire osseuse : la biodégradabilité et la biocompatibilité. À travers différents procédés de mise en forme, les hydrogels peuvent

acquérir une structure poreuse, on parle alors de matrices poreuses d'hydrogel, qui sont des substituts osseux très prometteurs (Liu and Ma, 2004).

1.4.1 Nature des polymères constituants les matrices d'hydrogel

Les polymères utilisés pour la fabrication des matrices d'hydrogel peuvent être d'origine synthétique comme les acides polyglycoliques (PGA), les acides polylactiques (PLA), les oxydes de polyéthylène (PEO), les polycaprolactone (PCL), les polylmétacrylates de méthyle (PMMA) ou encore les alcools polyvinyliques (PVA) (Liu and Ma, 2004). Ils peuvent également être des protéines d'origine naturelle, dérivés de la matrice extracellulaire de tissus de mammifères, comme le collagène de type I, ou produits par des insectes, comme la soie (Li et al., 2014). Les polysaccharides sont aussi très utilisés et sont extraits de la carapace des insectes (chitosane) ou extraits de plantes (amidon) et d'algues marines (fucoïdane). Les polysaccharides peuvent aussi être produits par des champignons comme le pullulane ou transformés à partir de saccharose par des bactéries comme le dextrane.

1.4.2 Méthodes pour la mise en forme des matrices poreuses d'hydrogel

La mise en forme des hydrogels consiste à créer une structure poreuse, avec de pores de taille moyenne variable (de 10 µm à 800 µm) avec une hétérogénéité plus ou moins marquée, de forme variable (allongée et alignée ou bien arrondie) et formant un réseau de pores plus ou moins interconnectés (Liu and Ma, 2004). La structure poreuse obtenue dépend du procédé de formulation. Il existe différentes techniques de fabrication des matrices d'hydrogel, produisant différentes structures poreuses (Liu and Ma, 2004).

- Les techniques de précipitation et lixiviation (lavage) utilisent une phase sacrificielle (cristaux de sels ou matériaux solubles) pour créer des pores de taille particulièrement homogène et contrôlée par la taille des produits sacrifiés (Ma and Langer, 1998).

- Les méthodes de dégazages de gaz dissous, principalement le CO_2, produisent des pores particulièrement bien interconnectée (Cooper, 2000).

- L'électrofilage permet de créer des matrices fibreuses avec des fibres de quelques nanomètres de diamètre à plusieurs micromètres (Li et al., 2001).

- L'impression 3D permet la création de matrices dont l'architecture est préalablement conçue numériquement, ce qui permet une maitrise de la forme des pores avec une résolution qui dépend du système d'impression (injection, extrusion, polymérisation) (Bose et al., 2013).

- Les méthodes de séparation de phases s'effectuent grâce à un changement d'état d'une phase incluse dans l'hydrogel sous l'effet de la température, par exemple lors de la solidification en glace de l'eau contenue dans les hydrogels. C'est ce que l'on appelle le « ice-templating » (Deville, 2006).

C'est la méthode de séparation de phases par « ice-templating » qui est utilisée pour la fabrication de l'hydrogel poreux de cette thèse.

1.4.3 Production d'une matrice poreuse d'hydrogel par « ice-templating »

Les méthodes de séparation de phases par congélation sont généralement suivies d'une lyophilisation (Padilla et al., 2011) et reposent sur le principe du « ice-templating », où la solidification de l'eau contenue dans l'hydrogel met en forme le polymère (Deville, 2006). La glace sublimée lors de la lyophilisation laisse place aux pores. Ces méthodes produisent des matrices avec une grande porosité, généralement plus de 90% (Whang et al., 1995).

La congélation de l'hydrogel peut avoir lieu alors que les polymères sont en suspension dans l'eau, c'est le cas des matrices de collagène par exemple (Campbell et al., 2017; Schoof et al., 2001). Ou bien, les polymères sont réticulés pour former un réseau avant d'être congelés et lyophilisés (Kang et al., 1999; Lavergne et al., 2012).

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'influence des conditions de congélation pour modifier la structure poreuse de la matrice d'hydrogel (Autissier et al., 2010; Brougham et al., 2017; O'Brien, 2004; Qian and Zhang, 2011). Un intérêt particulier a été porté sur la température de congélation imposée par trempage thermique car elle permet de créer des structures poreuses de plus en plus fines, allongées et unidirectionnelles à mesure qu'elle décroit. Par exemple, pour un hydrogel de gélatine réticulé et congelé à -20°C ou -80°C dans des congélateurs ou à -196 °C dans l'azote liquide (Kang et al., 1999).

1.4.4 Une matrice poreuse d'hydrogel de polysaccharides conçue pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Cette thèse étudie la mise en œuvre d'un hydrogel de polysaccharides réticulés pour l'ingénierie tissulaire osseuse (Catherine Le Visage et al., 2015; Fricain et al., 2013). Le réseau de polymère est obtenu après réticulation chimique par du sodium trimetaphosphate (STMP) d'un mélange de polysaccharides en phase aqueuse constitué de pullulane et de dextrane (Autissier et al., 2010). L'hydrogel est lyophilisée pour obtenir une matrice poreuse avec une congélation qui suit un refroidissement lent et contrôlé (Autissier et al., 2010; Lavergne et al., 2012). Les détails de fabrication de la matrice poreuse de cette matrice sont décrits dans le Chapitre II, à la section 1. .

L'utilisation de ces matrices poreuses d'hydrogel de pullulane et dextrane a été envisagée pour la régénération de différents tissus, comme les muscles (Autissier et al., 2007) ou les vaisseaux sanguins (Chaouat et al., 2006; Thébaud et al., 2007), mais aussi pour la production de thrombocytes (Pietrzyk-Nivau et al., 2015). Pour l'ingénierie tissulaire osseuse, des matrices poreuses composites sont fabriquées à partir de l'hydrogel de polysaccharides (pullulane et dextrane) et de cristaux d'hydroxyapatite (Fricain et al., 2013). Ce biomatériau a prouvé ses propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction lors de l'implantation in vivo chez le rat et la chèvre (Fricain et al., 2013). De plus, il peut être fabriqué en une solution injectable (Fricain et al., 2018), une formulation reconnue pour faciliter l'utilisation en clinique (Al-Abboodi et al., 2014). Les chapitres III et IV présentent les résultats d'élaboration et de caractérisation des matrices d'hydrogel.

Afin d'optimiser les propriétés de ce biomatériau pour l'ingénierie tissulaire osseuse, il est nécessaire de développer un modèle d'évaluation expérimentale. La section 2. présente la revue bibliographique des systèmes *in vitro* existants.

2. Modèles expérimentaux d'études in vitro de la régénération osseuse

La guérison d'un défaut osseux est un procédé biologique lent et complexe faisant intervenir plusieurs cellules aux fonctions diverses selon le stade de la guérison (section 1.2). Dans le cas d'un défaut de taille critique, la guérison peut être assistée par un biomatériau aux multiples propriétés (section 1.3). Dans le but d'optimiser les propriétés du biomatériau, les études *in vitro* sont des étapes préalables à l'expérimentation *in vivo* chez l'animal. La force des résultats obtenus *in vitro* dépend du modèle d'étude choisi.

2.1 Le choix des cellules pour les études des biomatériaux *in vitro*

Le comblement d'un défaut osseux est un procédé biologique lent et complexe qui fait intervenir plusieurs types de cellules spécialisées suivant l'étape de la consolidation osseuse considérée (section 1.2). Dans le cas d'un défaut de taille critique, les procédés naturels de guérison peuvent être assistés par un biomatériau présentant les caractéristiques nécessaires à la formation d'un tissu osseux (section 1.3).

1) Réponse des cellules lors de l'implantation du biomatériau

L'évaluation de la biocompatibilité du biomatériau requiert une combinaison d'études portant sur la cytotoxicité et la résolution de l'inflammation (Sheikh et al., 2015). La cytotoxicité est évaluée en mesurant la survie de cellules en contact direct ou indirect avec le biomatériau. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse, les fibroblastes et les ostéoblastes sont majoritairement choisis pour mener ce types d'études (Alt et al., 2004). L'inflammation, bien que nécessaire dans les premiers jours de la réparation osseuse, doit pouvoir être contenue pour éviter l'échec de la greffe (Mountziaris and Mikos, 2008). C'est pourquoi le caractère pro-inflammatoire des biomatériaux doit être évalué. *In vitro*, ces expérimentations sont réalisées à l'aide des cellules immunitaires comme les macrophages (Xia and Triffitt, 2006).

2) Capacité du biomatériau à accompagner la formation osseuse

L'ostéoinduction des biomatériaux peut être étudiées grâce à des cellules souches mésenchymateuses (Li et al., 2011; Lin et al., 2009). L'objectif est d'évaluer la capacité du biomatériau à induire la différenciation des cellules souches vers la voie ostéoblastique. Pour cela, on évalue l'expression de gênes, par exemple, Runx2 (Komori, 2009) et on dose des protéines de différentiation, par exemple, ALP et OP (Owen et al., 1990). L'ostéoconduction est ensuite évaluée grâce à des ostéoblastes (Beuvelot et al., 2009; Li et al., 2011). Pour ce faire, on étudie la minéralisation de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes. Ces méthodes *in vitro* fournissent une estimation de la capacité du biomatériau à accompagner la formation d'un cal osseux dur *in vivo*.

3) Dégradabilité du biomatériau lors de la reconstruction osseuse

La biodégradabilité du biomatériau et sa capacité de résorption par les cellules sont des paramètres essentiels à contrôler (Taylor et al., 2002). Les études *in vitro* impliquent l'utilisation d'ostéoclastes (Bernhardt et al., 2017; Schilling et al., 2006), parfois en co-culture avec des ostéoblastes (Heinemann et al., 2011). Dans le procédé de comblement du défaut osseux, la néo vascularisation joue un rôle primordial. C'est pourquoi des études *in vitro* incluent également des cellules souches progénitrices de cellules endothéliales (Guerrero et al., 2013; Thébaud et al., 2007).

4) Pertinence du choix de la source de cellules ostéoblastiques

Lorsque les propriétés d'ostéoconduction des biomatériaux sont étudiées *in vitro* à l'aide d'ostéoblastes, se pose la question de l'origine des cellules. Les cellules peuvent être prélevée directement dans un organisme sain (animal ou humain). On parle alors de cellules primaires qui, cultivées *in vitro,* atteignent la senescence au bout de quelques divisions cellulaires. Les cellules peuvent également provenir d'un tissu tumoral (animal ou humain). Lorsque ces cellules sont immortalisées, on parle de cellules de lignée. Les cellules de lignée possèdent l'avantage de pouvoir être cultivées in vitro sans altération de leur physiologie au cours du temps. Les cellules de lignée présentent ainsi l'avantage de fournir un stock reproductible de cellules. Cependant, Czekanska et al. (2014) mettent en évidence la pertinence accrue pour les études *in vitro* des ostéoblastes primaires d'origine humaine par rapport aux cellules de lignées. Toutefois, lorsque les études sont menées avec des cellules de lignée, Czekanska et al. (2014) démontrent que la lignée de pré-ostéoblastes de souris MC3T3E1 est la plus pertinente en vue d'une extrapolation des résultats aux cellules primaires humaines.

2.2 La pertinence des modèles *in vitro* en 3D

In vivo, l'environnement physiologique des cellules est par nature tridimensionnel. Cet environnement 3D est le siège d'interactions physico-chimiques complexes (**Figure 2**). Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, la reproduction *in vitro* d'un environnement 3D est indispensable pour la pertinence physiologique des études (Griffith and Swartz, 2006).

1) L'organisation 3D des cellules en sphéroïdes

Les interactions entre les cellules déterminent la physiologie de leur développement. Elles sont favorisées lorsque les cellules s'organisent en amas sphériques appelés sphéroïdes (Fennema et al., 2013). Les sphéroïdes fournissent un environnement de proximité pour les cellules avec de fortes concentrations locales en signaux chimiques produits par les cellules et une intrication de celles-ci avec la matrice extracellulaire. Cette configuration permet de conserver les cellules souches dans leur état physiologique de base non différencié (Baraniak and McDevitt, 2012). D'autres cellules plus spécialisées ont également montré *in vitro* des comportements physiologiques en sphéroïdes qui ne pouvaient pas être reproduit en 2D. C'est le cas par exemple des sphéroïdes de cellules hépatiques (Gunness et al., 2013). Dans le contexte de

l'ingénierie tissulaire, les sphéroïdes sont considérés comme les briques élémentaires constitutives des tissus (Laschke and Menger, 2017).

2) Les biomatériaux comme support de culture en 3D

Les biomatériaux conçus pour l'ingénierie tissulaire et qui ne favorisent pas l'adhésion des cellules sont particulièrement bien adaptés pour la culture de cellules sous forme de sphéroïdes en 3D grâce à leur structure poreuse (Bae et al., 2011; Guerrero et al., 2018). Les cellules peuvent envahir librement la porosité interconnectée du biomatériau lors de leur ensemencement (Pietrzyk-Nivau et al., 2015) ou bien les cellules peuvent être directement encapsulées dans le biomatériaux lors sa fabrication, par exemple dans des billes d'alginate de calcium (Coward et al., 2009).

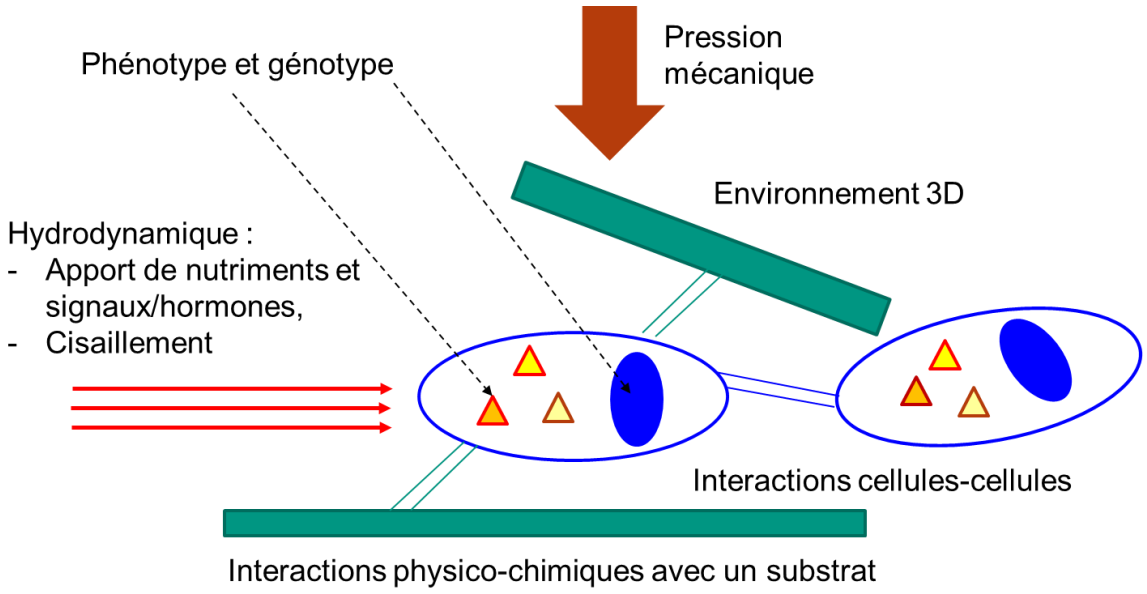


Figure 2 – Illustration des différentes interactions physico-chimiques couplées qui s'exercent dans l'environnement 3D autour d'une cellule.

3) Les limites de la culture 3D en conditions statiques

In vivo, le transport des espèces chimiques est assuré par le réseau vasculaire à l'échelle des organes et par le liquide interstitiel ou la lymphe à l'échelle des cellules. *In vitro*, la culture standard de cellules s'effectue dans un milieu nutritif au repos, sans écoulement, qui est renouvelé régulièrement (voir Chapitre II, section 4.1.3). Ces conditions sont qualifiées de culture statique. Dans le cas d'une concentration importante de cellules, à l'échelle d'un sphéroïde ou à l'échelle d'un biomatériau cellularisé, des gradients de concentration en nutriments et en espèces chimiques apparaissent, ce qui peut provoquer le manque de ressources pour le fonctionnement des cellules et l'accumulation de produits toxiques (Rath et al., 2012; Volkmer et al., 2008). De plus, l'absence d'écoulement d'un fluide prive les cellules de sollicitations mécaniques en cisaillement. Ces contraintes mécaniques sont reconnues pour

leur rôle biologique dans la réparation osseuse via le mécanisme de mécano-transduction (Mullender et al., 2004).

2.3 Les bioréacteurs à perfusion pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, la culture de cellules *in vitro* au sein d'un biomatériau est limitée par les phénomènes de diffusion et de transport des espèces chimiques. Ce constat a conduit au développement de systèmes de culture 3D avec écoulement qualifiés de systèmes de culture dynamique.

2.3.1 Différents designs de bioréacteurs avec écoulement

Plusieurs systèmes de culture *in vitro* ont été développé pour permettre l'écoulement du milieu nutritif et contourner les limitations de culture statique. Selon leur design (**Figure 3**), ces systèmes de culture dynamique peuvent servir de modèle d'étude ou d'outils de production en masse de cellules.

1) Les chambres d'écoulement

Il s'agit de systèmes dédiés à l'étude des relations fondamentales qui lient le comportement biologique des cellules et les conditions hydrodynamiques d'écoulement (Frangos et al., 1988). La chambre est un système continu avec une entrée et une sortie qui permettent la circulation du fluide. Les cellules sont cultivées en 2D sur une paroi de la chambre où le cisaillement est directement contrôlé par le débit du fluide (Bacabac et al., 2005). Ces dispositifs sont souvent miniaturisés dans le cadre de la microfluidique et permettent d'appliquer des contraintes de cisaillement homogènes sur les cellules, ce qui permet de mesurer la différentiation d'ostéoblastes cultivés en 2D en fonction du taux de cisaillement (Chabanon et al., 2012; Leclerc et al., 2006).

2) Les bioréacteurs à agitation mécanique

Il s'agit de dispositifs sans circulation extérieure de fluide (en batch) où le fluide interne est mis en mouvement par agitation mécanique, par exemple à l'aide d'un barreau magnétique. Leur volume est supérieur aux chambres d'écoulement et constitue une réserve nutritive en excès pour les cellules ce qui permet de dépasser les limites de croissance en conditions statiques de culture (Sikavitsas et al., 2002). Ces dispositifs sont bien adaptés à la production en masse de cellules mais moins à l'étude fondamentale des comportements biologiques *in vitro* du fait de la complexité du champ de vitesses de l'écoulement (Goldstein, 2001). Les cellules peuvent être cultivés directement dans des biomatériaux qui sont maintenus fixes au sein du volume agité (Rauh et al., 2011).

3) Les bioréacteurs à perfusion

Il s'agit de systèmes continus avec une entrée et une sortie permettant la circulation du fluide. Ils se différencient des chambres d'écoulement du fait de leur volume disponible pour les biomatériaux (Yeatts and Fisher, 2011). On distingue deux types de bioréacteurs à perfusion (David et al., 2011). Les bioréacteurs à perfusion indirecte permettent l'écoulement du fluide autour des biomatériaux, dans la macroporosité du bioréacteur, tandis que les bioréacteurs à perfusion directe forcent l'écoulement dans la microporosité des biomatériaux. L'apport en nutriment et les sollicitations mécaniques par cisaillement du fluide sont alors mieux répartis au sein du biomatériau dans le cas de la perfusion directe (Rauh et al., 2011). Les bioréacteurs à perfusion directe ont montré de fort taux de prolifération de cellules osseuses (ostéoblastes ou cellules souches en voie de différentiation) dans les biomatériaux perfusés (Bancroft et al., 2002; Goldstein, 2001; Janssen et al., 2006). Cependant, une limitation des bioréacteurs à perfusion directe est l'effet d'engorgement qui peut survenir lorsque les cellules prolifèrent jusqu'à boucher les pores. Les bioréacteurs à perfusion indirecte permettent d'obtenir des biomatériaux fortement cellularisés, qualifiés de bio-hybrides, qui ont montré des succès de comblement osseux dans de large défaut chez le gros animaux (David et al., 2011).

Le bioréacteur à perfusion à indirect est le dispositif d'étude *in vitro* retenu pour les expérimentations biologiques de cette thèse.

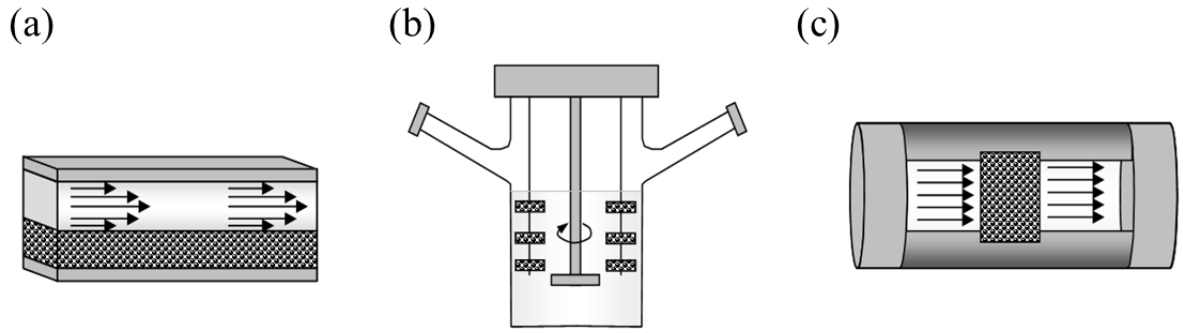


Figure 3 – Schémas de trois types de systèmes de culture in vitro avec écoulement, tiré de (Oddou et al., 2010). L'écoulement est désigné par des flèches et les biomatériaux sont représentés par des hachures. (a) une chambre d'écoulement, (b) un bioréacteur à agitation mécanique et (c) un bioréacteur à perfusion directe.

2.3.2 **Modélisations d'un bioréacteur à perfusion**

La modélisation et les techniques de simulations permettent de rationaliser les résultats expérimentaux en bioréacteur. Dans les bioréacteurs à perfusion, l'écoulement produit des cisaillements qui semblent favorables aux cellules (Yeatts and Fisher, 2011). Les cisaillement perçus par les cellules peuvent être calculés grâce à la mécanique des fluides (Wittkowske et al., 2016). En ajoutant les équations de transport et de bilan de matière, les concentrations en

produits chimique dans l'environnement des cellules peuvent également être calculées (Chung et al., 2007)

1) Estimation du cisaillement moyen grâce au débit de perfusion

Le plus souvent, les résultats biologiques témoignant de l'effet des cisaillements du fluide sur les cellules sont présentés uniquement en fonction du débit de perfusion (Cartmell et al., 2003). Cependant, lorsque l'information sur la microporosité du biomatériau perfusé est disponible, il est possible d'estimer l'ordre de grandeur du cisaillement moyen en fonction du débit de perfusion (Goldstein, 2001). En supposant que le débit *Q* traverse uniformément le biomatériau de diamètre *D*, constitué de pores de diamètre d, pour une porosité de ε, la vitesse moyenne dans les pores υ_m se calcule ainsi :

$$\upsilon_{\mathrm{m}} = \frac{Q}{\varepsilon\,\pi\left(\frac{D}{2}\right)^2} \qquad (1)$$

Le cisaillement moyen aux parois des pores est donné par :

$$\tau_w = 8\,\frac{\mu\,\upsilon_{\mathrm{m}}}{d} \qquad (2)$$

où μ est la viscosité dynamique du fluide.

Cette modélisation suppose la perfusion directe du biomatériau poreux. Pour la perfusion indirecte d'un empilement de biomatériaux, Chabanon et al. (2019) proposent d'estimer τ_w grâce à l'estimation de la perméabilité *K* de l'empilement suivant la loi de Carman-Kozeny (Carman, 1939) :

$$K = \frac{\varepsilon}{s^2 k} \qquad (3)$$

où *s*, est la surface spécifique au contact du fluide et *k* est la constante de Kozeny (Happel and Brenner, 1981).

Le nombre de Reynolds Re_K permet de décrire le régime de l'écoulement et se calcule ainsi :

$$Re_K = \frac{\rho \mathrm{V_d} K^{0,5}}{\mu} \qquad (4)$$

où ρ est la masse volumique du fluide et V_d est la vitesse débitante, c'est-à-dire le débit-vitesse calculé sur la section du bioréacteur vide.

Pour Re_K très petit devant 1, l'écoulement est en régime de Darcy et τ_w est donné par :

$$\tau_w = \mu \left(\alpha \frac{S}{\varepsilon^2} \right) V_d \quad (5)$$

avec α un paramètre à calibrer qui dépend de l'empilement dans le bioréacteur. Par exemple, pour un empilement aléatoire de sphères avec une macroporosité de 50%, Warren and Stepanek (2008) proposent α = 3,07.

2) Calcul numérique du champ de vitesse dans un bioréacteur à perfusion

Les modélisations présentées ci-dessus ne permettent pas de décrire les variations spatiales du cisaillement causées par les variations de porosité dans le biomatériau. Pour capturer ces variations locales, la géométrie du bioréacteur et des biomatériaux peut être numérisée par une technique d'acquisition 3D, comme la tomographie à rayon X (Voronov et al., 2010). On obtient alors un clone numérique du bioréacteur avec une résolution de l'ordre du micromètre.

La plupart des techniques de simulation reposent sur un maillage numérique de la géométrie du bioréacteur. Pour les méthodes de discrétisation par éléments de volume fini, l'étape de maillage définit des volumes élémentaires de taille variable s'appuyant sur l'acquisition 3D (McCoy et al., 2012). C'est une opération complexe qui peine à décrire les formes petites et rugueuses (Jungreuthmayer et al., 2009). Les méthodes de Boltzmann sur réseau permettent de définir un maillage régulier correspondant directement à la résolution de l'acquisition 3D (d'Humières, 2002). Cette méthode est particulièrement bien adaptée aux géométries complexes et microstructurées (Rivière, 2005). Plusieurs travaux ont montré l'aboutissement de simulation du champ de vitesse dans des bioréacteurs soit à partir de géométries virtuelles (Cruel et al., 2015), soit à partir d'acquisitions réelles (Thibeaux et al., 2019). Les méthodes de Boltzmann permettent également de calculer le cisaillement du fluide ainsi que de décrire les phénomènes de transports d'espèces chimiques dans le bioréacteur comme l'oxygène et le glucose (Hossain et al., 2015a).

Une méthode de Boltzmann sur réseau à temps de relaxations multiples (d'Humières, 2002; Ginzburg et al., 2010) a été retenue dans le Chapitre V pour simuler l'écoulement du fluide et le transfert d'oxygène dans le bioréacteur à perfusion.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

–

Une approche multi-échelle et pluridisciplinaire

1. Fabrication d'un biomatériau poreux pour la culture cellulaire en trois dimensions

Cette section a pour objectif de définir le protocole et les conditions de production du biomatériau poreux qui a été l'objet d'étude principale de cette thèse. Il s'agit d'un hydrogel de polysaccharides réticulés, lyophilisé et poreux.

1.1 Préparation de la solution aqueuse de polysaccharides

Une solution aqueuse de polysaccharides est obtenue suite à l'ajout d'eau permutée au mélange de poudres de polysaccharides et sels. Environ 50 mL de solution aqueuse sont produits par lot et conservés à température ambiante et protégés de la lumière dans un tube en polypropylène de 50 mL Fisherbrand™ enrobé d'aluminium pour une durée maximale de deux mois. Le protocole d'obtention de la solution est décrit ci-dessous. Les concentrations finales sont calculées dans le **Tableau 1** à partir de la densité mesurée et des fractions massiques. Cette préparation porte la nomenclature « PUDNA » au sein du laboratoire LVTS pour Pullulane-Dextrane-NaCl.

Produits
- 9,00 g Pullulane 200 000 $g.mol^{-1}$ de chez Hayashibara
- 3,00 g Dextrane 500 000 $g.mol^{-1}$ de chez Pharmacosmos
- 14,0 g NaCl de chez Thermofischer
- 40 ml d'H_2O permutée

Verrerie et matériels
- Bécher de 100 mL
- Barreau magnétique octocylindrique
- Agitateur magnétique
- Balance de pesée de précision 5 mg

Protocole
- Poser le barreau magnétique au fond du bécher et tarer la balance de pesée
- Peser directement dans le bécher les trois poudres pullulane, dextrane et NaCl
- Réaliser un mélange homogène par agitation à 500 tours-minute pendant 30 minutes
- Verser en une seule fois le volume d'eau et maintenir l'agitation 30 minutes
- Stocker 3 jours à température ambiante la solution jusqu'à dégazage des bulles d'air avant utilisation

1.2 Réticulation chimique des polysaccharides pour former un hydrogel

Un hydrogel de dimensions contrôlées L*l*h est obtenue par réticulation de la solution de polysaccharides PUDNA. La réticulation a lieu en conditions basiques (pH > 13,9) à 50°C pendant 20 minutes grâce à un réticulant, le Sodium Trimetaphosphate (STMP). Le protocole

est décrit ci-dessous pour un hydrogel de nomenclature « PUDNA 3% » et est illustré dans la **Figure 1**. Le chiffre 3% exprime en $g.g^{-1}$ la fraction de STMP introduite dans le mélange réactionnel pour une quantité initiale de solution PUDNA.

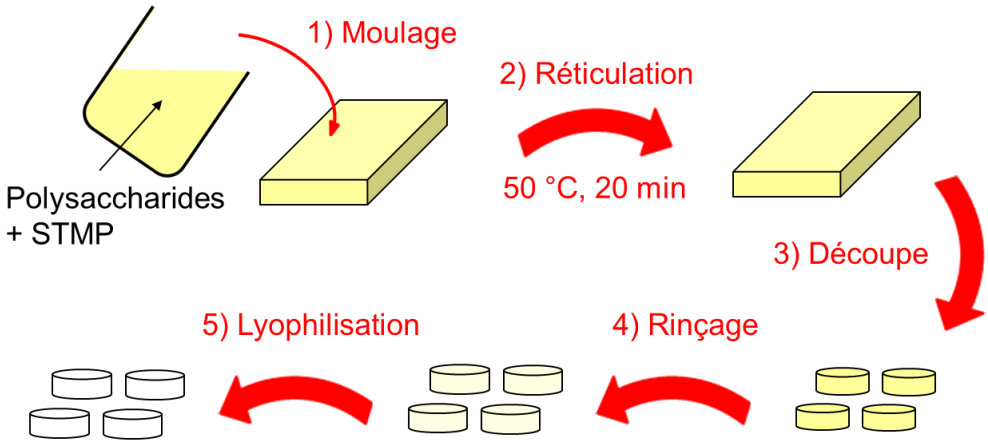


Figure 4 – Schéma simplifié de l'élaboration de matrices cylindriques lyophilisées et poreuses d'hydrogel de polysaccharides réticulés.

Les concentrations finales sont calculées dans le tableau **Tableau 1** à partir de la densité mesurée et des fractions massiques. On définit le taux de réticulant *r* comme le ratio des moles de STMP par les moles totales de polysaccharides dans la solution finale au début de la réticulation. Il s'agit d'un paramètre clé dont le rôle est étudié dans la suite ce cette thèse. Pour l'hydrogel « PUDNA 3% », r = 96 $mol.mol^{-1}$.

Produits
- 10,0 g solution de polysaccharides PUDNA
- 1 mL NaOH à 10 $mol.L^{-1}$
- 1 mL d'H_2O permutée
- 0,300 g de STMP (sodium trimetaphosphate) pour PUDNA 3%

Verrerie et matériels
- Bécher de 30 mL
- Barreau magnétique octocylindrique
- Agitateur magnétique
- Bac à ultra-son (Transonic 080, Prolabo) avec glace et eau
- Moule aux dimensions : L = 10 cm, l = 5 cm, h = 1 mm
- Etuve 50°C

Protocole
- Poser le barreau magnétique au fond du bécher et tarer la balance de pesée
- Peser directement dans le bécher la quantité de solution PUDNA
- Ajouter la soude sous faible agitation
- Placer 5 minutes le mélange réactionnel aux ultra-sons pour éliminer les bulles d'air

- Réaliser la suspension de STMP dans 1 mL d'H_2O, mettre sous agitation
- Préparer le moule
- Verser la suspension de STMP dans le mélange réactionnel, sous forte agitation
- Couler rapidement l'hydrogel en cours de réticulation dans le moule
- Placer dans l'étuve à 50°C pendant 20 minutes

« PUDNA »	**Solution de polysaccharides**			**Solution pour réticulation**			**Masse**
« 3% »	$kg.kg^{-1}$	$kg.m^{-3}$	$mol.L^{-1}$	$kg.kg^{-1}$	$kg.m^{-3}$	$mol.L^{-1}$	$g.mol^{-1}$
Pullulane	0,136	169	1,07E-03	0,108	130	8,18E-04	158 800
Dextrane	0,0455	56,4	1,98E-04	0,036	43,3	1,52E-04	284 900
H_2O	0,606	752	41,7	0,633	761	42,3	18,02
NaCl	0,212	263	4,50	0,168	202	3,46	58,44
STMP	-	-	-	0,0238	28,6	9,35E-02	305,9
NaOH	-	-	-	0,032	38,1	0,953	40,00
Densité		1241			1204		

Tableau 1 – Concentrations des espèces chimiques en solution. Cas d'une solution de polysaccharides PUDNA qui est réticulée après ajout de NaOH et de STMP pour former un hydrogel « PUDNA 3% ».

1.3 Mise en forme et rinçages des matrices d'hydrogel

L'hydrogel aux dimensions L*l*h est découpé en forme de cylindres à l'aide d'un emporte-pièce aux dimensions suivantes : rayon = 2,5 mm et h = 1 mm. On définit ainsi le plan basal XY et la hauteur d'axe Z pour la suite du chapitre. Les matrices sont placées dans un tamis et immergés pendant 30 minutes dans du PBS 10x en excès pour neutraliser le pH basique. Les matrices d'hydrogel sont rincées abondamment dans plusieurs bains d'H_2O osmosée par tranche de 20 minutes au minimum et jusqu'à ce que le milieu atteigne une conductivité mesurée inférieure à 540 $\mu S.cm^{-1}$. Les matrices sont rincées dans des bains de NaCl à 0,250 $g.L^{-1}$ jusqu'à équilibre à 540 $\mu S.cm^{-1}$. Pour atteindre un équilibre complet, le dernier bain de NaCl est conduit jusqu'au lendemain (« overnight »). Dans ce solvant de faible conductivité, les matrices gonflent et mesurent 5,5 cm de rayon et 2 mm de hauteur, pour un volume $V = 200 \pm 20\ mm^3$.

Finalement, à partir de 10 g de solution de polysaccharides PUDNA il est possible de produire environ 100 à 150 matrices d'hydrogel. Les bains de rinçage auront consommé environ 500 mL de PBS 10x, 2L d'H_2O osmosée et 1L de NaCl à 0.250 $g.L^{-1}$.

1.4 Elaboration de matrices d'hydrogel poreuses par lyophilisation.

Les matrices rincées et équilibrées dans du NaCl à 0,250 $g.L^{-1}$ sont égouttées, puis placées au fond de boîte de Pétri en polystyrène (VWR, 391-0875), plan basal XY horizontal, pour former une monocouche de matrices accolées. Les boîtes de Pétri sont disposées sur les plateaux d'un lyophilisateur MUT (Cryotech®) préalablement équilibré à 15°C. Une sonde de température (thermocouple) est mise en contact avec la partie supérieure des matrices (c'est la sonde « produit »). Le couvercle des boîtes de Pétri est laissé entrouvert pour permettre l'échappement de la vapeur d'eau.

Le procédé de lyophilisation s'effectue en trois étapes : 1) Congélation, 2) Lyophilisation primaire 3) Lyophilisation secondaire. Ci-dessous, sont décrites les conditions standards pour l'élaboration de matrices poreuses.

1) Congélation

Une pente de refroidissement lente est imposée aux plateaux avec un taux constant de – 0,1°$C.min^{-1}$ de 15°C à -20°C, suivi d'un maintien au froid à 20°C pendant 1h30. Durant le refroidissement, la surfusion des matrices est clairement identifiée d'une part visuellement, d'autre part grâce à l'enregistrement de la sonde produit. La température des plateaux T_p au moment où la recalescence a lieu définit le degré de surfusion $\Delta T = T_f - T_p > 0$ avec T_f la température de fusion de l'eau. On considère la température de fusion de l'eau à 1 atm, $T_f = 273{,}15$ K et donc ΔT (°C) = $-T_p$ (°C). Après surfusion, la recalescence est suivie de la solidification des matrices. La congélation s'effectue sous pression légèrement sub-atmosphérique pour garantir l'étanchéité de la chambre en vue de la lyophilisation primaire.

2) Lyophilisation primaire

La lyophilisation primaire consiste en la sublimation de l'eau libre contenue dans les matrices d'hydrogel et solidifiée lors de l'étape de congélation. Un vide relatif de 50 Pa est obtenu dans la chambre de lyophilisation par pompage (RV12, Edwards®). Parallèlement les plateaux subissent un réchauffement de 0.1°$C.min^{-1}$ jusqu'à atteindre -5°C. La lyophilisation primaire se poursuit à -5°C pendant 8h et se conclue par un réchauffement jusque 10°C à 0,2 °$C.min^{-1}$. Une consigne de sécurité limite le lancement de la lyophilisation secondaire tant que la température de la sonde produit n'atteint pas 10°C.

3) Lyophilisation secondaire

La lyophilisation secondaire consiste en la sublimation de l'eau liée contenue dans les matrices d'hydrogel, solidifiée lors de l'étape de congélation et résiduelle après la lyophilisation primaire. Le vide relatif est maintenu à 1 Pa et la température des plateaux est imposée à 30°C. Les conditions de lyophilisation secondaire sont conservées jusqu'à l'arrêt du lyophilisateur par l'expérimentateur. Le critère d'arrêt est une sonde « produit » stable en température et au-dessus de 25°C.
Après lyophilisation, les matrices d'hydrogel poreuses et déshydratées, sont stockées à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un récipient clos.

2. Étude des étapes du procédé de fabrication de l'hydrogel poreux

Cette section introduit des variantes vis-à-vis des conditions classiques de production de l'hydrogel poreux dans le but d'étudier les différents paramètres de contrôle de l'élaboration. En particulier le taux de réticulant a été étudié pour les valeurs suivantes : r = 48, 72, 96 et 161 mol.mol^{-1}.

2.1 Étude des propriétés mécanique de l'hydrogel avant lyophilisation par rhéologie

L'élasticité de l'hydrogel est faible, de l'ordre de quelques Pa à quelques kPa. Dans ce contexte, la caractérisation par rhéologie est bien adaptée. L'hydrogel subit une sollicitation mécanique périodique de fréquence $f\ (Hz) = \frac{\omega(rad)}{2\pi}$ et répond par une déformation complexe. Le rapport entre la sollicitation et la déformation est le module dynamique complexe de cisaillement G^* (Pa). Il est décomposé en une partie réelle G' (Pa) appelé le module d'élasticité (ou de stockage) et en une partie imaginaire G'' (Pa) appelé le module de viscosité (ou de perte). On définit la phase δ (rad), telle que $\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$.

G' et G'' (ou de façon équivalente G' et $\tan(\delta)$) sont mesurés avec le rhéomètre Discovery HR-2 (TA Instrument®) équipé d'un contrôle en température par effet Peltier à eau. Deux géométries ont été utilisées : une géométrie cône-plan et une géométrie plan-plan (voir ci-dessous). Ci-dessous les conditions de mesure sont détaillées car G' et G'' dépendent de nombreux paramètres comme la température, l'amplitude et la fréquence de cisaillement, la géométrie de mesure et son entrefer ou le solvent. Le logiciel TRIOS permet la visualisation et le post-traitement avant export des données expérimentales.

Avant chaque série de mesure, la friction et l'inertie de la géométrie sont calibrées et validées. La dilatation thermique de l'ensemble plan Peltier et géométrie est calibrée entre 20°C et 55°C. L'entrefer est calibré à la température de mesure.

2.1.1 Étude de la réticulation de la solution de polysaccharides

1) <u>Cinétique de gélification à temps court</u>

La solution aqueuse de polysaccharides pullulane et dextrane « PUDNA » décrite à la section 1.1 est liquide avant la réticulation chimique avec le STMP (section 1.2). L'étude de la dynamique de réticulation reproduit la méthode décrite par (Lack et al., 2004). L'évolution temporelle de $\tan(\delta)$ est mesurée pour différente fréquence d'oscillation couvrant au minimum une décade. Le croisement des courbes temporelles s'effectue en un point remarquable appelé point de gélification (Winter & Chambon, 1986). L'étude de la gélification est effectuée pour quatre taux de réticulant r = 48, 72, 96 et 161 mol.mol^{-1}.

Une géométrie cône-plan lisse en acier inoxydable avec un angle de 2.006°, un diamètre de 40 mm et une troncature à 52 µm est utilisée. La température du Peltier est fixée à 25°C. 1 mL de solution PUDNA en cours de réticulation est rapidement versée au centre du plan de base. La géométrie supérieure conique est rapidement amenée à troncature, ce qui a pour effet de rejeter le surplus de solution visqueuse en dehors de la géométrie. Un ébavurage est réalisé à l'aide d'une raclette et une pellicule d'huile de tournesol non miscible est appliqué avec un pinceau autour de la géométrie pour isoler la solution en cours de réticulation.

La procédure de mesure du rhéomètre consiste en une sollicitation répétée au cours du temps (« Time sweep ») toutes les 30 secondes et pour des oscillations de fréquences : 0.5 Hz, 1 Hz, 2 Hz et 5 Hz. L'amplitude des oscillations est fixée pour une déformation maximale de 0,1% qui garantit une mesure dépendant très peu de l'amplitude (régime linéaire). Cette condition a été vérifiée dans le cas extrême pour une fréquence de 5 Hz, à 20 minutes de réticulation et au taux de réticulant le plus élevé : $r = 161$ mol.mol^{-1} lors d'un balayage en amplitude (« Amplitude sweep) de 0,01% à 1%.

La dynamique de gélification à 50°C (température du procédé, section 1.2) n'a pas pu être étudiée dans ces conditions pour les raisons suivantes.
i) À 50°C, le point de gélification est atteint avant de pouvoir amener la géométrie conique à la distance de troncature.
ii) La procédure suivante a été essayée : l'hydrogel est mis en place à 25°C puis la température est élevée à 50°C pour réaliser la mesure. Cependant, l'élévation de la température provoque une dilatation de l'hydrogel qui entraine une contrainte axiale faussant la mesure et qui n'a pas pu être compensée.

2) Reproduction du procédé de réticulation complet

Le procédé complet de réticulation a été reproduit et analysé par le rhéomètre dans des conditions très similaires au procédé standard et pour quatre taux de réticulant r = 48, 72, 96 et 161 mol.mol^{-1}. Une géométrie plan-plan lisse en acier inoxydable d'un diamètre de 40 mm est utilisée.

2 mL de solution PUDNA en cours de réticulation est rapidement versée sur le plan Peltier dont la température est fixée à 25°C. La géométrie plane est amené à distance de travail pour un entrefer de 1 mm. Un ébavurage est réalisé à l'aide d'une raclette et une pellicule d'huile de tournesol non miscible est appliqué avec un pinceau autour de la géométrie pour isoler la solution en cours de réticulation. La température du plan Peltier est élevée à 50°C avec une condition de contrôle de la force axiale à 0 ± 0.1 N, conservée tout au long de la mesure. L'augmentation de l'entrefer due à la dilation de l'hydrogel ne passe pas les 6 µm pour toutes les conditions testées. La procédure de mesure du rhéomètre consiste en une sollicitation répétée au cours du temps (« Time sweep ») toutes les 30 secondes et pour des oscillations de fréquences : 0.5 Hz, 1 Hz, 2 Hz et 5 Hz. L'amplitude des oscillations est fixée pour une déformation maximale de 0,1% qui garantit une mesure dépendant très peu de l'amplitude (régime linéaire). Cette condition a été vérifiée le cas extrême, pour une fréquence de 5 Hz, à

20 minutes de réticulation et au taux de réticulant le plus élevé : r = 161 mol.mol^{-1} lors d'un balayage en amplitude (« Amplitude sweep) de 0,01% à 1%.

2.1.2 Caractérisations des propriétés du réseau réticulé de l'hydrogel

L'hydrogel réticulé est constitué d'un réseau de chaines de polysaccharides liées par des liaisons chimiques suite à la réticulation avec le STMP. Ce réseau possède des propriétés de gonflement qui dépendent de la nature du solvant. L'élongation des chaines du polymère est déterminée par leur constitution et le nombre de ponts entre les chaines. La mesure de la densité de ces ponts et de la taille de maille du réseau sont l'objet des mesures présentées ci-dessous.

1) Estimation du poids moléculaire moyen en nombre M_n du mélange de polysaccharides

Les poids moléculaires moyens en nombre ($M_n^{Pul,Dex}$) et en masse ($M_w^{Pul,Dex}$), ainsi que le rayon de gyration ($R_n^{Pul,Dex}$) du pullulane et du dextrane ont été mesurés par diffusion de lumière (TREOS, Wyatt Technology) après séparation chromatographique à exclusion de taille dans une colonne PWxl Guardcolumn (TSK-GEL) grâce à un HLPC. L'indice de réfraction est choisi à 0,14 mL.g^{-1} selon Bonnard (2014) pour une longueur d'onde de 657 nm. Le solvant de séparation est du nitrate de sodium $NaNO_3$ (0,15 mol.L^{-1}) supplémenté d'azide (0,2 g.L^{-1}). Le débit de la colonne est fixé à 0,5 mL.min^{-1}. Les solutions de pullulane (10 g.L^{-1}) et de dextrane (10 g.L^{-1}) sont analysées séparément. Le poids moléculaire moyen en nombre du mélange de polysaccharides est alors calculé ci-dessous :

$$M_n = \left(\frac{x_{Pul}}{M_n^{Pul}} + \frac{x_{Dex}}{M_n^{Dex}}\right)^{-1} \tag{6}$$

où, x_{Pul} = 0,75 et x_{Dex} = 0,25 sont les fractions massiques de pullulane et de dextrane dans le mélange (voir section 1.1).

2) Mesure par pesée du taux de gonflement en volume Q de l'hydrogel

Les fractions volumiques du polymère dans l'état relaxé v_{2r} et dans l'état gonflé v_{2s} sont calculées à partir de la mesure des masses de l'hydrogel dans l'état relaxé W_r ou gonflé W_s et de la masse sèche de l'hydrogel W_d. Pour la mesure de W_d, l'hydrogel est séché sous vide à 50°C pendant 4 jours après rinçage complet dans de l'H_2O permutée afin d'éliminer toutes traces de sels. Il est supposé que les volumes partiels spécifique de l'eau et du polymère ne dépendent pas de leur concentration et que le polymère se comporte comme un système infiniment dilué. Le volume partiel spécifique du polymère, v = 0.0006125 m^3.kg^{-1} résulte de la moyenne en masse des volumes partiel spécifique du dextrane (İmren et al., 2006) et du pullulane (Nishinari et al., 1991). Le volume partiel du solvant aqueux est assimilé à sa masse volumique ρ_r pour le solvant de l'état relaxé et ρ_s pour le solvant de gonflement. ρ_r est mesuré par pesée d'un volume connu d'hydrogel juste après réticulation, ρ_r = 1409 kg.m^{-3}. Les fractions volumiques et le taux de gonflement sont calculés comme tels :

$$v_{2r,s} = \frac{W_d\, v}{\left(\left(W_{r,s} - W_d\right)/\rho_{r,s}\right) + W_d\, v} \tag{7}$$

$$Q = \frac{1}{v_{2\mathrm{r},s}} \tag{8}$$

On définit Q, le taux de gonflement en volume de l'hydrogel comme l'inverse de la fraction volumique de polymère. Le taux de gonflement de l'hydrogel lyophilisé puis réhydraté (hydrogel poreux texturé) sera noté Q^t par opposition à Q^{nt}, le taux de gonflement de l'hydrogel avant lyophilisation (hydrogel non-texturé).

3) Calcul de la taille de réseau ξ et estimation du nombre de liaisons par chaînes dans le réseau de polysaccharides réticulés

Le réseau de polysaccharides réticulé est caractérisé par le poids moléculaire moyen en nombre entre deux liaisons : M_c. Il permet de déduire la taille caractéristique du réseau, ξ qui dépend de la conformation de la chaîne de polymère entre deux liaisons.

En supposant que l'hydrogel réagisse aux faibles déformations en suivant la théorie d'élasticité de Treloar (1975), « rubber elatsic therory », le module de cisaillement G est relié à M_c par l'équation suivante (Anseth et al., 1996; Peppas and Merrill, 1977) :

$$G = \frac{\mathrm{R\,T}\, C_{2r}}{M_c}\left(1 - \frac{2M_c}{M_n}\right)\left(\frac{v_{2r}}{v_{2r}}\right)^{-\frac{1}{3}} \tag{9}$$

où R est la constante des gaz parfait (R = 8.314 J.mol^{-1}.K^{-1}), T est la température (K) et C_{2r} est la concentration de polymère (kg.m^{-3}) dans l'état relaxé, après réticulation. C_{2r} est calculée comme le produit de la concentration en polymère avant réticulation (**Tableau 1**) et du ratio des densités après et avant réticulation, soit C_{2r} = (130+43)*1409/1204 = 203 kg.m^{-3}.

L'équation (9) est valide si les chaînes de polymère ont une conformation qui suit une statistique gaussienne (Treloar, 1975). Cette hypothèse est vérifiée tant que les chaines ne sont pas trop étirées (Treloar, 1975), c'est-à-dire tant que la distance relative de bout-en-bout d'une chaîne de polymère est inférieur à 0,3. Les résultats du Chapitre III à la section 3.1 montrent que cette condition est satisfaite.

La distance de bout-en-bout d'une chaîne dans l'état non-perturbé $\left(\overline{r_0^2}\right)^{\frac{1}{2}}$ peut se déduire de M_c. Cependant, il n'existe pas de modèle pour le cas d'un mélange de polymères, en particulier un mélange de pullulane (linéaire) et de dextrane (ramifié). Deux cas limites sont alors étudiés, l'un supposant que l'hydrogel est constitué à 100% de pullulane, l'autre supposant que l'hydrogel est constitué à 100% de dextrane. Le poids moléculaire moyen en nombre M_c^{Pul} ou M_c^{Dex} est calculé grâce à l'équation (9) en substituant M_n par M_n^{Pul} (hypothèse 100% pullulane)

ou M_n^{Dex} (hypothèse 100% dextrane). La distance de bout-en-bout d'une chaîne dans l'état non-perturbé sous l'hypothèse 100% pullulane est calculée ainsi :

Hypothèse 100% pullulane : $$\left(\overline{r_0^2}\right)^{\frac{1}{2}} = l\left(\left(M_c^{pul}/M_r\right)C_\infty\right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

avec M_r = 0.162 kg.mol^{-1} le poids moléculaire de l'unité répétitive d'alpha-D-glucose et de longueur l = 4.79 Å constituant le pullulane et de ratio caractéristique limite C_∞ = 4.3 d'après Buliga et Brant (1987).

La distance de bout-en-bout d'une chaîne dans l'état non-perturbé sous l'hypothèse 100% pullulane est calculée ainsi :

Hypothèse 100% dextrane : $$\left(\overline{r_0^2}\right)^{\frac{1}{2}} = 0{,}071\sqrt{M_c^{dex}} \quad (11)$$

avec le facteur 0,071 nm.g$^{-½}$.mol^{½} proposé par Imren et al. (2006).

Puis, la taille de réseau ξ se déduit de $\left(\overline{r_0^2}\right)^{\frac{1}{2}}$ grâce au facteur d'élongation α d'après Canal et Peppas (1989) :

$$\xi = \alpha\left(\overline{r_0^2}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

En supposant un gonflement isotrope de l'hydrogel, le facteur d'élongation est directement lié à la fraction volumique de l'hydrogel gonflé (Canal and Peppas, 1989), soit :

$$\alpha = {v_{2s}}^{-\frac{1}{3}} \quad (13)$$

En supposant l'absence de défaut dans le réseau (boucle, pincement ou chaîne pendante), le nombre de liaisons par chaîne de polymère, n_l est calculé à partir de M_c :

$$n_l = \frac{1}{2}\left(\frac{M_n}{M_c} - 1\right) \quad (14)$$

Une preuve pour l'équation (14) est donnée dans l'annexe 6.3 du Chapitre IV.

4) Mesure par rhéologie du module de cisaillement *G* de l'hydrogel gonflé

Après réticulation, l'hydrogel est découpé à l'aide d'un emporte-pièce aux dimensions suivantes : rayon = 6 mm et h = 1 mm. Après rinçage et équilibre dans du NaCl (0.250 g.L^{-1}),

l'hydrogel gonflé est découpé avec un emporte-pièce aux dimensions suivantes : rayon = 20 mm et h = 2,3 mm. Dans cet état, la surface de l'hydrogel est très glissante et la géométrie plan-plan lisse utilisée précédemment (section 2.1.1) n'est plus adaptée pour des mesures de rhéologie avec sollicitation en cisaillement. Une géométrie plan-plan striée de 20 mm de diamètre est utilisée pour éviter le glissement de l'hydrogel lors de la mesure. La température du Peltier est fixée à 37°C. Une coupelle permet l'immersion complète de l'hydrogel dans le solvant et un équilibre thermique accru.

La distance de l'entrefer est standardisée grâce à une réduction constante de l'entrefer à 1 $\mu m.s^{-1}$ depuis 2,4 mm jusqu'à compenser les effets de saut de surface (Kendall, 2004). La force axiale ainsi contrôlée est suffisante pour l'adhésion et limite la compression de l'hydrogel (force axiale inférieur à 0.1 N). Les mesures en oscillations sont effectuées pour une rampe de fréquence de 0,05 Hz à 5 Hz (« Frequency sweep) avec une déformation maximale de 0,05 %. Ce taux de déformation garantie d'être dans le domaine linéaire qui a été déterminé par une rampe en amplitude de 0,01% à 1% (Amplitude sweep ») à 1 Hz.

Pour les calculs de M_c avec l'équation (9), G est assimilé à la valeur de G' à 1 Hz, puisque l'hydrogel présente un comportement essentiellement élastique (voir les résultats du Chapitre III à la section 3.1)

2.1.3 **Détermination de la quantité de réticulant greffé sur les chaînes de polymère**

Un dosage des fonctions phosphoester présentes sur les chaînes de polysaccharides de l'hydrogel est effectué par colorimétrie après dissolution dans le l'acide nitrique concentré (Lanouar et al., 2018). L'hydrogel est équilibré dans de l'H_2O permutée puis déshydraté par séchage sous vide à 50°C pendant 24h. Une masse d'environ 50 mg d'hydrogel est pesée précisément et introduite dans des tubes blindés préalablement pesés. L'hydrogel est totalement dissous pendant 3h dans un bain sec (Raecti-Vap™, 18760) à 105°C dans 5 mL d'acide nitrique HNO_3 à 10% ($g.mL^{-1}$) obtenue après dilution de HNO_3 à 65% (w07006-2.5L, Sigma Aldrich®). La quantification de l'orthophosphate PO4 s'effectue suivant la méthode colorimétrique fondée sur l'absorbance du complexe d'acide vanadomolybdophosphorique ($H_{3n}PVMo_{12-n}O_{40}PV_n$) de couleur jaune (Heslop and Ramsey, 1969). L'hydrolysat acide d'hydrogel est introduit dans une fiole jaugée de 50 mL avec 2 mL de HNO_3 à 10% ($g.mL^{-1}$), 10 mL de solution de vanadate d'ammonium NH_4VO_3 (21,37 $mmol.L^{-1}$) et de HNO3 (1,458 $mol.L^{-1}$), 10 mL de solution d'heptamolybdate d'ammonium $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (40,45 $mmol.L^{-1}$) et complétée au trait de jauge par de l'H_2O permutée. Après 15 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 405 nm (Infinite M200 Pro, TECAN®). La concentration initiale de PO4 est déduite des mesures d'absorbance grâce une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une gamme d'acide phosphorique H_3PO_4 entre 0 et 400 $\mu mol.L^{-1}$ (9 points), traitée dans les mêmes conditions.

Les travaux de Lack et al. (2007) ainsi que de Sang et al. (2007) suggèrent que dans les conditions standards de réticulation de l'hydrogel (section 1.2) le greffage du réticulant STMP

sur les chaînes de polymère (R) résulte uniquement en des monoesters (R-O-PO3) ou des diesters (R-O-PO_2-O-R'). C'est pourquoi, la quantité de PO4 mesurée par colorimétrie sera directement reliée à la quantité de fonctions phosphoester greffées lors de la réticulation. À noter que la proportion de monoester par rapport au diester est estimée grâce à la mesure du nombre de liaisons (diester) par chaîne, n_l (section 2.1.2).

2.2 Étude de la congélation des matrices d'hydrogel

L'hydrogel des matrices avant lyophilisation est poreux à l'échelle nanométrique (de l'ordre de la taille de réseau ξ). Les matrices sont lyophilisées pour créer une porosité d'échelle micrométrique. Le principe repose sur la sublimation de l'eau contenue dans l'hydrogel qui, lors de sa solidification, façonne le réseau de polymère. Cette mise en forme, appelée « ice-templating », motive l'étude de la solidification de l'hydrogel selon le protocole de congélation choisi pour la lyophilisation (section 1.4).

2.2.1 Dispersion des degrés de surfusion lors de congélation des matrices d'hydrogel

Pour déterminer la dispersion des degrés de surfusion des matrices d'hydrogel lors de la lyophilisation, le protocole proposé par Vali (1994) pour des gouttes d'eau a été adapté. Des séries de 36 matrices séparées d'une distance de deux fois et demi leur diamètre ont été congelées sur fond de boîte de Pétri carrées en polystyrène de 120 mm placées sur les plateaux du lyophilisateur. La germination de grains de glace dans l'hydrogel en surfusion s'accompagne de la recalescence (élévation de la température à T_f) : phénomène rapide et visible par changement d'opacité qui permet de déterminer le degré de surfusion ΔT. De façon à enregistrer plus facilement ΔT pour chaque matrice, la pente standard de refroidissement (section 1.4) a été augmentée à -0,2°C.min^{-1}. Ainsi une observation visuelle directe des matrices, toutes les minutes, pendant 1h15 permet de déterminer ΔT à 0,2°C entre 5°C et 20°C. À noter qu'il sera prouvé dans les résultats du Chapitre III à la section 3.2 que le processus de germination n'est pas modifié par cette augmentation de la pente.

Le nombre de matrices non solidifiées (en surfusion) est noté $N(t)$. Le taux de solidification, $R(t)$ est définit par Vali (1994) comme le nombre de matrices qui se solidifient par minute divisé $N(t)$. $R(t)$ est calculé à partir des variations expérimentales de $N(t)$:

$$R(t) = -\frac{N(t+\Delta t) - N(t-\Delta t)}{2\Delta t}\frac{1}{N(t)} \qquad (15)$$

avec Δt = 2 min.

Une expérience dédiée de congélation dans le lyophilisateur a été menée dans le but de mesurer les variations de $R(t)$ selon la pente de refroidissement. Une série de 98 matrices a été refroidie de 15°C à -15°C avec une pente de - 0,2°C.min^{-1}. Un plateau de température à -14°C a été imposé pendant 30 minutes avant d'imposer à nouveau une pente de refroidissement de

- 0,2°C.min^{-1} jusque -20°C. Le plateau a été fixé 1°C au-dessus du point d'arrêt de la première pente à -15°C ce qui permet de reproduire le dépassement («overshoot ») proposé par Vali (1994).

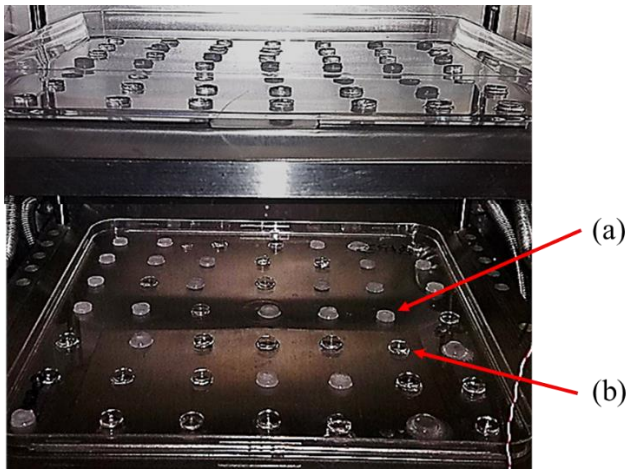


Figure 5 – Congélation de 98 matrices d'hydrogel directement dans le lyophilisateur selon un protocole temps-température inspiré de Vali (1994). Les matrices sont espacées de deux fois et demi leur diamètre. Le changement rapide d'opacité lors de la recalescence permet de compter le nombre d'évènements de solidification dus à la germination. Sur l'étage inférieur, 25 matrices sur 49 sont déjà solidifiées. Exemple : (a) est solidifiée, (b) est en surfusion.

Durant les phases de refroidissement, les résultats expérimentaux (Chapitre III, section 3.2) montrent que $R(t)$ suit une loi exponentielle en fonction du temps. Comme la pente de refroidissement, r_c est constante, $R(t)$ suit une fonction exponentielle $R(T_p)$ (par substitution de $T_p = t\, r_c$ + constante) que l'on exprime sous la forme :

$$R(T_p) = ae^{-bT_p} \tag{16}$$

En supposant que la germination suit l'hypothèse singulière (G. Vali, 2008), par opposition à l'hypothèse stochastique, la concentration de germes par unité de volume et par degré, $k(T_p)$ se calcule comme :

$$k(T_p) = -\frac{R(T_p)}{V\, r_c} \quad [\text{germe.cm}^{-3}.°\text{C}^{-1}] \tag{17}$$

2.2.2 Contrôle du degré de surfusion des matrices d'hydrogel

Pour étudier l'effet du degré de surfusion sur la solidification des matrices, des lots de matrices possédant le même degré de surfusion sont réalisés. La pente de refroidissement est fixée à -0,2°C.min^{-1} et le suivi de ΔT est conduit comme indiqué dans la section 2.2.1. En pratique, deux méthodes différentes sont employées et fondées sur le fait que la germination d'une matrice déclenche la germination des matrices qui lui sont accolées.

i) méthode passive : les matrices d'hydrogels sont réparties en groupes de 3 à 4 matrices accolées. La distribution naturellement des degrés de surfusion produit alors des lots de matrices avec différents ΔT.
ii) méthode active : lorsque $T_p = - \Delta T$ désiré, un saut de pression est imposé dans la chambre du lyophilisateur. Il est obtenu en programmant la lyophilisation primaire, ce qui entraîne une dépression, puis la consigne est arrêtée au bout de 30 secondes et le vide est cassé grâce à la vanne prévue à cet effet, ce qui provoque un retour à la pression atmosphérique. La perturbation déclenche la germination des matrices.

2.2.3 Caractérisations par cryo-microcopie électronique à – 100°C des matrices d'hydrogel solidifiées

Les matrices sont congelées dans le lyophilisateur avec un degré de surfusion de ΔT = 10 ± 0,2°C fixé grâce à la méthode passive, puis extraites du lyophilisateur avant de subir la lyophilisation primaire. Les matrices congelées sont stockées au congélateur – 80°C avant d'être analysées par microscopie électronique à balayage.

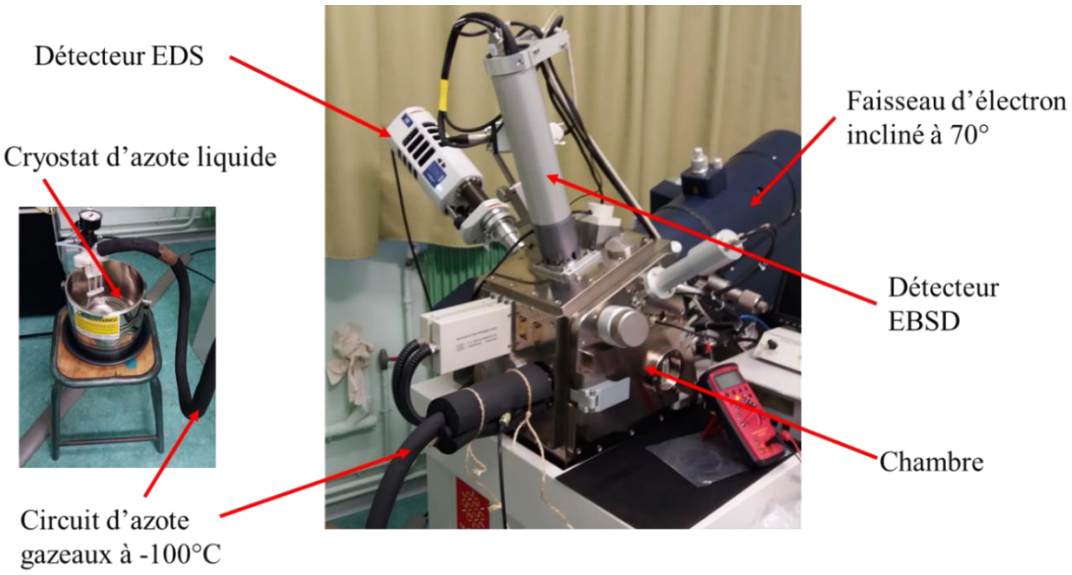


Figure 6 – Installation expérimentale dédiée à l'analyse EBSD + EDS, CamScan Crystal Probe X500FE, Géosciences de Montpellier, Université de Montpellier. Un cryostat d'azote liquide refroidit un circuit d'azote gazeux à -100°C pour permettre l'observation d'échantillon de glace à -100°C à 1 Pa, avec une sublimation limitée de la glace.

Des essais préliminaires conduits avec l'ingénieur Alexandre Tanguy du Laboratoire de Mécaniques des Solides, UMR7649, Ecole Polytechnique ont confirmé qu'un maintien à -20°C des échantillons grâce à une nacelle Peltier n'était pas suffisant pour empêcher la sublimation de l'échantillon. Ces résultats ont motivé la collaboration avec l'ingénieur de recherche Fabrice Barou de Géosciences de Montpellier, Université de Montpellier pour réaliser des analyses de cryo-microcopie électronique à – 100°C. Le microscope est un CamScan Crystal Probe X500FE, équipé d'une nacelle de refroidissement à l'azote gazeux, lui-même refroidit à travers

un bain d'azote liquide. La colonne une colonne d'émission des électrons est inclinée à 70°. Cette configuration permet d'analyser la diffraction des électrons rétrodiffusés (Electron BackSackterring Diffraction, EBSD, détecteur C1001 GATAN) en conservant l'échantillon à plat et à – 100°C. L'ensemble du protocole de mesure a initialement été développé pour l'analyse de glaces géologiques (Montagnat et al., 2015).

Les matrices sont préparées dans un congélateur à -60°C par polissage à l'aide d'une lame de microtome de leur surface. L'objectif est d'enlever le givre et obtenir une surface plane. Les matrices sont collées sur le porte échantillon à l'aide d'une goutte d'eau. Le diamètre des matrices est limé pour s'ajuster à la largeur du porte échantillon de 12 mm. Le transfert dans la chambre du microscope s'effectue le plus rapidement possible en limitant le temps où la chambre est entrouverte et à pression atmosphérique. L'échantillon est maintenu entre -90°C et -100°C sous une pression de 1 Pa. La tension d'accélération est fixée à 20 kV et la distance de travail est de 25 mm. L'analyse EBSD est menée avec un pas de 20 µm à une fréquence d'acquisition de 20 Hz. L'analyse EBSD est couplée à une analyse chimique par spectroscopie à rayon X et dispersion d'énergie (EDS).

La suite logiciel Aztec® (Oxford Instruments HKL) est utilisée pour l'indexation des clichés de diffraction EBSD et la superposition des spectres d'analyses EDX. La glace formée à pression atmosphérique et conservée au-dessus de -120°C présente une cristallographie di-hexagonale et di-pyramidale du groupe 186 avec les paramètres de mailles : a = 4.51 Å et c = 7.34 Å. Avec ces paramètres, l'indexation est réussie sur plus de 90 % de la surface et avec une résolution angulaire de 0,5°. La suite logiciel Channel5® permet le traitement des données EBSD pour créer les cartes d'orientation crystalline (Inverse Pole Figures, IPF) ainsi que les projections hémisphériques des orientations en figures de pole.

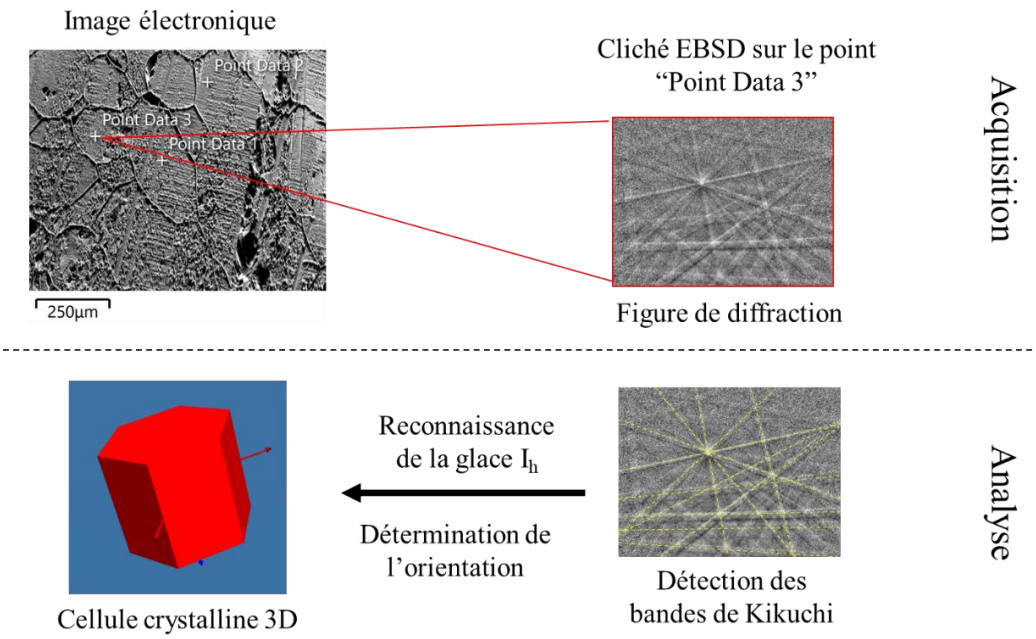


Figure 7 – Procédure schématique de l'analyse EBSD depuis l'acquisition des clichés de diffraction jusqu'à la détermination de l'orientation crystalline de la glace hexagonale I_h. Ces opérations sont conduites par la suite logiciel Aztec® (Oxford Instruments HKL).

On définit un grain de glace comme une zone indexée continue présentant une déviation de moins de 10° de l'orientation cristallographique. La taille d'un grain est la racine carrée de sa surface.

3. Caractérisations des matrices d'hydrogel poreuses après lyophilisation

Après lyophilisation, l'eau solidifiée a texturé l'hydrogel et est sublimée, ce qui fait apparaître une structure poreuse. L'analyse de cette structure est menée dans l'état déshydraté et dans l'état hydraté après gonflement.

3.1 Caractérisations de la porosité des matrices déshydratées

3.1.1 Observations qualitatives de la porosité par microscopie électronique à balayage

Les matrices d'hydrogel lyophilisé sont découpées orthogonalement dans le plan XZ à l'aide d'une lame de rasoir (0.12HD, ASR) sous forme de tranches d'environ 1 mm d'épaisseur. Les tranches sont collées sur des pastilles double face carbone. L'analyse qualitative des pores est conduite par microscopie à balayage à 40 Pa de pression (« low vacum »), 20 kV d'accélération et une distance de travail de 12 mm. Les microscopes SEM- ESEM (QUANTA 200, FEI) présent au LGPM et SEM (JSM-IT100, JEOL) présent au LVTS ont été alternativement utilisé selon leur disponibilité.

3.1.2 Analyse quantitative complète de la porosité par tomographie à rayon X

La structure poreuse des matrices d'hydrogel lyophilisé est analysée en 3D par un nano-tomographe à rayon X (EasyTom xL 150/160, RX-Solutions) avec une résolution de $(6\ \mu m)^3$. Le tube à micro-focus fonctionne avec une tension de 50 kV et une intensité de 120 µA. Le détecteur est un plan matriciel de silice amorphe (ASMP) de 1920 * 1536 pixels. 1440 radiographies sont obtenues pour un temps d'exposition de 0,2s s et moyennées sur 10 images. La reconstruction est effectuée en 2 minutes environ sur 4 cartes graphiques GPU (NVidia GTX1089). Le volume 3D complet est constitué d'un empilement de tranches 2D produite par le logiciel Avizo® (Themo Scientific™).

On définit un pore comme un volume d'air délimité par le réseau de polysaccharides déshydraté. Les pores sont isolés par traitement d'image avec le logiciel Avizo® (Themo Scientific™) en suivant la procédure ci-dessous :

- Seuillage de l'image en niveau de gris pour sélectionner largement l'hydrogel
- Elimination du bruit par méthode de comblement des trous (« hole filling ») en 3D, avec un voisinage à 27 points.
- Séparation 3D des pores par méthode d'inondation (« watershed algorithm) avec un marqueur de 1 et un voisinage à 27 points.
- Identification 3D des pores avec un voisinage de 27 points (« labelling »).

Les pores sont ensuite analysés géométriquement pour obtenir leur volume et l'orientation de l'axe principale de leur équivalent elliptique : angle polaire φ et angle azimut θ. La taille des pores est la racine cubique de leur volume.

3.2 Caractérisations de la porosité des matrices hydratées

3.2.1 Détermination de la porosité par mesures de gonflement

La mesure du taux de gonflement en volume (section 2.1.2) pour l'hydrogel texturé par lyophilisation, Q^t et pour l'hydrogel non texturé avant lyophilisation, Q^{nt} permet de mesurer la porosité texturée, ε. En effet, la porosité correspond à la fraction de volume occupée par l'eau seule (V_{eau}) dans l'hydrogel texturé (V_{eau} + $V_{hydrogel}$), soit :

$$\varepsilon = \frac{V_{eau}}{V_{eau} + V_{hydrogel}} = \frac{(Q^t - Q^{nt})}{(Q^t - Q^{nt}) + Q^{nt}} = 1 - \frac{Q^{nt}}{Q^t} \qquad (18)$$

Q^t et Q^{nt} sont mesurés dans différents solvants aqueux avec une conductivité croissante : NaCl (0,250 $g.L^{-1}$), NaCl (1 $g.L^{-1}$), NaCl (9 $g.L^{-1}$) et PBS.

3.2.2 Analyse quantitative de la porosité par imagerie microscopique confocale

L'hydrogel a été préalablement marqué par substitution de 0,17% ($g.g^{-1}$) de dextrane 500 kDa FITC (TdB Consultancy) fluoresçant dans le vert. Après lyophilisation, les matrices d'hydrogel sont réhydratées dans du NaCl (0,250 $g.L^{-1}$) pendant 24h. Une tranche orthogonale dans le plan XZ (obtenue grâce à une lame de rasoir 0.12HD, ASR) est analysée sous microscope laser confocal (CLSM, ZEISS LSM700) sur 250 µm de profondeur en 43 coupes 2D de résolution 2,5 µm. Une tranche horizontale XY de 250 µm de profondeur a été analysée par microscopie biphotonique (LEICA, SP8) en 13 coupes 2D de résolution 0,692 µm.

On définit les pores comme des surfaces d'eau entourées d'hydrogel gonflé et fluorescent. La surface des pores est calculée par traitement d'images avec Fiji (ImageJ) impliquant un seuillage, un filtre médian et l'utilisation du plugin 3D Object Counter. La taille des pores est la racine carrée de leur surface.

3.2.3 Détermination de l'effet de filtre dû à la porosité lors de l'ensemencement de microsphères synthétiques.

Des suspensions de tampon phosphate (PBS) et de tension actif Tween 80® à 1% ($g.mL^{-1}$) contenant 5 ‰ ($cm^3.mL^{-1}$) des microsphères synthétiques de polyéthylène (UVPMS-BR, Cospheric LLC) marquées par un fluorochrome fluoresçant dans le rouge (composé industriel, Cospheric LLC) ont été réalisé. Les diamètres des microsphères sont : 3 ± 1 µm, 15 ± 5 µm, 58 ± 5 µm, 115 ± 10 µm, 275 ± 25 µm, 463 ± 38 µm et 655 ± 55 µm de sorte à couvrir une gamme de taille depuis l'ordre de grandeur d'une cellule animale (5 à 20 µm) jusqu'à l'ordre de grandeur des plus grands pores des matrices lyophilisées (500 µm).

20 µL de suspension de microsphères d'un diamètre donné sont posées en une goutte sur la surface de matrices lyophilisées. Les matrices se contractent immédiatement par effet capillaire

et absorbent tout le volume. 60 µL de PBS sont ajoutés en trois fois, espacées de 5 minutes, puis un excès de 250 µL PBS est fourni pour atteindre le gonflement complet des matrices. Ce protocole reproduit celui de l'ensemencement des matrices avec des cellules (section 4.2).

Les matrices ensemencées de microsphères sont analysées par CLSM suivant le même protocole qu'à la section 3.2.2. Le signal des microsphères fluorescente rouge est enregistré sur un second canal.

L'effet de filtre est défini comme le rapport de la taille moyenne des pores contenant des microsphères sur la taille moyenne de tous les pores. Si les microsphères ont colonisé de façon homogène l'ensemble des pores, sans distinction de taille, alors l'effet de filtre vaut 1. Si les microsphères ont colonisé en priorité les pores de grandes tailles, alors l'effet de filtre est supérieur à 1.

4. Étude in-vitro des matrices d'hydrogel poreuses en environnement biologique 3D dans un bioréacteur à perfusion

4.1 Culture d'une lignée cellulaire animale issue de la souris

Cette section décrit les moyens et les méthodes de culture d'une lignée de cellules animales.

4.1.1 Produits chimiques et biologiques pour la culture cellulaire

La liste des produits et réactifs utilisés est donnée dans le **Tableau 2**. Les produits sont stériles et adaptés pour la culture cellulaire. Les solutions α-MEM et DPBS sont conservées à 4°C. L' α-MEM est choisi sans acide ascorbique pour limiter la différentiation des cellules. Les autres produits sont aliquotés et stockés a – 20 C. Un aliquot est décongelé est conservé à 4°C selon les besoins. Avant aliquotage, le sérum FBS est décomplementé à 56°C pendant 30 minutes. Cette opération est héritée des bonnes pratiques de culture visant à éliminer certaines protéines sensibles à la chaleur pouvant provoquer des réactions immunitaires par les cellules et à éliminer d'éventuelles espèces contaminantes (mycoplasmes). Dans la suite, le terme « milieu α-MEM complet » désignera le milieu de culture composé à 90% ($mL.mL^{-1}$) de solution α-MEM et 10% ($mL.mL^{-1}$) de sérum FBS décomplementé.

Nom	Informations	Reference	Fournisseur
Minimun Essential Medium Alpha (α-MEM)	Avec nucléosides Sans acide ascorbique	22571-038	Gibco®
Fetal Bovine Serum (FBS)	Origine : Afrique du Sud	S1810-500	Dutscher®
DPBS	Sans calcium Sans magnésium	P04-36500	PAN biotech™
Trypsine/EDTA	0,05/0,02 % dans DPBS	P10-023100	PAN biotech™
Penicilline-Streptomycine	10 000 $u.mL^{-1}$ – 10 $mg.mL^{-1}$	P06-07100	PAN biotech™
DMSO	Liquide, pureté ≥ 99.9%	D8418	Sigma-Aldrich®

Tableau 2 – Listes de produits chimiques utilisés pour la culture cellulaire

4.1.2 Lignée cellulaire de pré-ostéoblastes MC3T3-E1

Des cellules de la lignée MC3T3-E1 au passage P23 ont été offertes par le Laboratoire de Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-articulaires (B3OA), CNRS UMR 7052, Faculté de Médecine Denis Diderot Paris7.

Les niveaux de sécurité biologique sont classés en quatre catégories du risque le plus faible (Niveau 1) au plus fort (Niveau 4) selon les critères listés dans le **Tableau 3**. Le risque qualifié associé à la lignée MC3T3-E1 est de niveau 1. Ainsi, toutes les expériences ont été menées en respectant strictement les règles d'hygiène et de sécurité d'un laboratoire de culture niveau 1

(MSSMat, CentraleSupélec) ou d'un laboratoire de culture niveau 2 (LVTS, Hôpital Bichat). Toutes les manipulations s'effectuent sous poste de sécurité microbiologique (PSM, SafefAST Classic 212) afin de préserver la stérilité des contenants, des solutions et des cultures biologiques.

Critère	**Niveau 1**	**Niveau 2**	**Niveau 3**	**Niveau 4**
Pathogène	Non	Probable	Oui	Maladie très grave
Dangereux pour l'opérateur	Non	Modérément	Risque élevé	Risque très élevé
Propagation	Non	Peu probable	Possible	Risque élevé
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement	/	Oui	Généralement	Non
Exemples	MC3T3-E1	Virus de la rougeole	VIH	Virus Ebola

Tableau 3 – Niveaux de risque biologique et critères associés (Risques biologiques, 2017, CNRS)

4.1.3 Conditions standards de culture

Les conditions standards de culture consistent en un environnement contrôlé en température (37°C), en humidité (phase liquide en équilibre avec une atmosphère à 100% de saturation) et en pH (7.2 -7.4). Ces conditions sont obtenues grâce à un incubateur (8000 DH CO_2 incubateur, ThermoScientific) qui se compose :

- d'une enceinte aux parois régulées en température 37°C.
- d'une réserve d'eau liquide qui sature l'enceinte hermétique en humidité par évaporation
- d'une entrée de CO2 gazeux (ALPHAGAZ 1) avec régulateur fixé à 5% (mL.mL-1)

La pression partielle en CO_2, pCO_2 = 0,05 permet un équilibre de molécules d'acide carbonique H_2CO_3 en solution dans le milieu de culture. Les ions hydrogénocarbonate HCO_3^- présent dans la composition du milieu sont la base conjuguée de H_2CO_3 et forment alors un tampon pH, tel que $pH = pK_a + \log([H_2CO_3]/[HCO_3^-]) = 7,3$. Le **Tableau 4** détaille les calculs intermédiaires conduisant à cette application numérique. Un indicateur coloré, le rouge de phénol qui apparait rouge-orangé autour de 7,4 permet à l'utilisateur de contrôler la qualité du pH.

Les cellules pré-ostéoblastes MC3T3-E1 adhérent au fond de boite de culture transparent en polystyrène traité offrant une surface de 75 cm² (« T75 », No 90076, TTP®) ou 150 cm² (« T150 », No 90151, TTP®). Les boîtes disposent d'un bouchon avec filtre hydrophobe en PTFE avec une taille de pore de 0.22 µm pour garantir les échanges gazeux et la stérilité. Le volume de milieu α-MEM complet est ajusté à la taille des boîtes à raison de 8 mL pour une « T75 » et 16 mL pour une « T150 ».

Grandeur physique	Nomenclature	Unités	Valeur
Constante de Henri à 37°C	H_{CO2} [T= 37°C]	$atm.L.mol^{-1}$	21,5
Pression partielle en CO2	pCO_2	$atm.atm^{-1}$	5,0
CO2 dissous en équilibre	$[CO_2^{aq}]$	mmol.L-1	2,3
Concentration en hydrogénocarbonate	$[HCO_3^-]$	mmol.L-1	39,6
Constant d'acidité	pK_a [T=37°C]		6,1
pH = $pK_a + \log([HCO_3^-]/[CO_2^{aq}])$	**pH**		**7,3**

Tableau 4 – Calcul du pH théorique du milieu de culture α-MEM supplémenté par 10% de SBF en équilibre avec 5% ($atm.atm^{-1}$) de CO_2 à 37°C. Le pouvoir tampon est obtenu grâce au couple acido-basique H_2CO_3 - HCO_3^-.

4.1.4 Contrôle de l'état de confluence des cellules

Par divisions cellulaires successives, les cellules MC3T3-E1 prolifèrent au fond des boîtes de culture. Un suivi microscopique en lumière blanche à l'aide d'un microscope inversé à contrat de phase (Axiovet 40 CFL, Zeiss®) permet d'apprécier l'état de confluence des cellules. La confluence est exprimée en pourcentage et est définie comme le ratio de la surface occupée par les cellules par la surface totale disponible. Pour l'enregistrement de l'état de confluence, le microscope est équipé d'une caméra numérique (AxioCam ICm 1, Zeiss®) contrôlée par un logiciel d'acquisition (AxioVision Rel. 4.8 Zeiss®). Dans les conditions standards de culture, la croissance des MC3T3-E1 est exponentielle pour des confluences faibles (**Figure 8** A-B) avec un doublement toutes les 36h (ATCC). Au-delà de 80% de confluence (**Figure 8** D), la croissance est limitée à cause de la réduction de l'espace disponible et des changements phénotypiques induits par la forte proximité des cellules (inhibition par le contact). Il est donc nécessaire d'effectuer régulièrement une opération appelée « passage » pour diminuer la confluence.

4.1.5 Entretien de cellules MC3T-E1 en phase exponentielle de croissance

Un passage est effectué pour une confluence d'au maximum 70% afin de maintenir une croissance exponentielle des cellules. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 15 minutes en présence de Trypsine/EDTA (Pan Biotech) après rinçage avec du DPBS. Les volumes sont ajustés à la taille des boites de culture : 2 mL pour une « T75 » et 4 mL pour une « T150 ». Après détachement, la suspension cellulaire est homogénéisée avec un même volume de milieu α-MEM complet pour bloquer l'action de la trypsine qui possède un effet délétère sur les cellules après 30 minutes. La suspension est centrifugée (Centrifuge 5702, Eppendorf®) pendant 5 minutes à 1 400 tours par minute (accélération de 300 à 400 g) dans un tube conique de 15 mL en polypropylène (No 91015, TTP®). Le surnageant contenant la trypsine est éliminé et le culot de cellules est suspendu dans un même volume de milieu α-MEM complet. Une proportion entre 1/6 et 1/8 de la suspension cellulaire est ensuite ensemencés dans une nouvelle boite de culture conformément aux recommandations de l'ATCC. La confluence se retrouve alors réduite dans les mêmes proportions. Cette opération est réalisée deux fois par semaine tous au long de l'activité d'expérimentation.

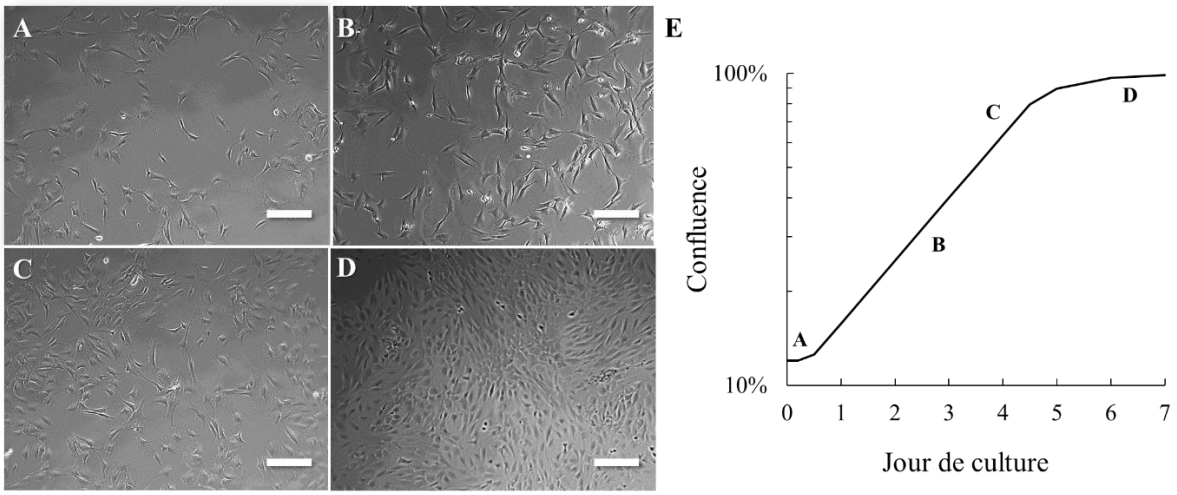


Figure 8 – Croissance de cellules MC3T3E1 sur fond de boîte de culture T75. Images pour différents états de confluence acquises au microscope inversé. (Objectif 10x, lumière blanche, auto-exposition, barre d'échelle de 20 µm). **A** : confluence faible, 15 %. **B** : confluence moyenne, 45%. **C** : confluence critique, 70% **D** : confluence quasi totale, 100%. **E** : Courbe typique de croissance des cellules exprimée en pourcentage de confluence avec une phase de latence (A), une phase de croissance exponentielle (B), une phase de ralentissement (C) et une phase de plateau (D).

4.1.6 Préservation par cryogénie des cellules MC3T3-E1

Après passage et expansion, une série de cryo-tubes (1 mL) est réalisée à partir de suspension cellulaire au passage P25 (500 000 cellules / mL) dans du milieu α-MEM complet supplémenté de 1% ($mL.mL^{-1}$) de DMSO (Sigma Aldrich). Issue de la mise en culture et de l'expansion d'un cryo-tube au passage P25, une seconde série de cryo-tubes d'environ 500 000 cellules au passage P27 est réalisée. Les cryo-tubes sont conservés dans un cryo-conteneur (Locator 8 Plus, Thermo Scientific) en présence d'azote liquide a – 178°C. Le cryo-conteneur est régulièrement approvisionné en azote liquide pour compenser l'évaporation. Après une période d'arrêt de l'activité ou lorsque les cellules ont atteint un nombre de passage critique (typiquement au-delà de 50), des cellules fraiches issues de la préservation au passage P27 sont utilisées pour initier une nouvelle activité. Lorsque le stock de cellules préservées au passage P27 est épuisé, un nouveau stock est réalisé à partir de cellules au passage P25.

4.2 Ensemencement des matrices poreuses avec des cellules ostéoblastes de souris

Les cellules de pré-ostéoblastes de souris MC3T3-E1 sont décollées à une confluence voisine de 70%. Pour de futures analyses par microscopie (section 4.4), le fluorochrome fluorescent rouge PKH-26 (Sigma-Aldrich) est inclus dans les membranes des cellules en suivant le protocole du fournisseur. Il s'agit d'un marquage qui préserve la viabilité des cellules et perdure 100 jours. Après comptage et dilution appropriée, une suspension cellulaire est réalisée à la concentration de 5, 16, 20 ou 30 millions de cellules par mL. Les matrices d'hydrogel

poreuses PUDNA 3% sont préalablement stérilisées en surface grâce à une illumination aux UV (VL-215.G, Bioblock Scientific), 15 minutes sur chaque face, à raison de 4 matrices par puits de plaque de culture 6 puits (TTP®). 20 µL de suspension cellulaire dans du milieu de culture α-MEM complet à la concentration désirée sont déposés à la surface des matrices poreuses pour un total de 100 000, 300 000, 400 000 ou 600 000 cellules par matrices. Immédiatement après l'ensemencement, 3 fois 20 µL de milieu de culture α-MEM complet sont ajoutés en toutes les 5 minutes. Puis, 1,5 mL de milieu de culture α-MEM complet avec 1% ($mL.mL^{-1}$) d'antibiotique Pénicilline-Streptomycine (**Tableau 2**) sont ajoutés par puits, le tout est conservé 24h dans l'incubateur.

4.3 Perfusion des matrices cellularisées dans un bioréacteur à perfusion

1) Description du bioréacteur à perfusion

Le bioréacteur à perfusion consiste en une chambre cylindrique en polycarbonate (PC) connectée par un ensemble de tubes flexibles en silicone de diamètre interne de 3,2 mm (R6504 – 26BPT, PharMed) à une réserve de 200 mL de milieu de culture α-MEM complet supplémenté avec 1% ($mL.mL^{-1}$) d'antibiotique Pénicilline-Streptomycine. Le bullage d'un mélange air-CO2 à 5% ($mL.mL^{-1}$) (MC CO2 5%/Air B50) à 15 $mL.min^{-1}$ permet d'équilibrer le pH du milieu de culture. Le milieu est perfusé à débit fixe au travers de la chambre grâce à une pompe péristaltique (Easy-load 3 ou Cole-Parmer, Masterflex) située à l'extérieur de l'incubateur 37°C (HERATerm, Thermo Scientific). Le milieu est conditionné en entrée de la chambre dans un conduit de 2 cm de long et 12 mm de diamètre afin de stabiliser le débit pulsatile créé par la pompe. La chambre du réacteur peut accueillir un tube en polypropylène (PP) de 4 cm de long et 12 mm de diamètre interne et ajusté au diamètre interne de la chambre.

2) Perfusion des matrices d'hydrogel cellularisées

Pour chaque expérimentation en bioréacteur, un empilement de 48 matrices d'hydrogel PUDNA 3% poreuses et cellularisées (section 4.2) est réalisé dans le tube en PP. Les matrices sont placées sur une hauteur de 3 cm selon une disposition aléatoire. En entrée et en sortie du tube en PP, sont insérées deux grilles en téflon d'épaisseur de 5 mm et perforée de trou de 1 mm de diamètre. La porosité des grilles est d'environ 50%.

L'ensemble des éléments : tube en PP, grilles en téflon, tuyaux en silicone et connections sont préalablement stérilisés par voie thermique dans un autoclave (AL02-01, Advantage-Lab). La chambre cylindrique en PC est stérilisée par voie chimique dans un bain d'eau de Javel (chlore actif à 0,05 $g.L^{-1}$) pendant 30 minutes puis rincée abondamment avec de l'H_2O doublement distillée et stérile. Une large utilisation d'éthanol 70% suivi d'un séchage sous atmosphère stérile permet de compléter le protocole de stérilisation.

Le débit de la pompe, $V_{perfusion}$ = 10 $mL.min^{-1}$, fixé pour la durée de l'expérimentation est atteint de manière progressive par palier de 2,5 $mL.min^{-1}$ toutes les 30 minutes. La vitesse débitante dans le bioréacteur, calculée pour un tube en PP vide est $V_{débitante}$ = 1,47 $mm.s^{-1}$.

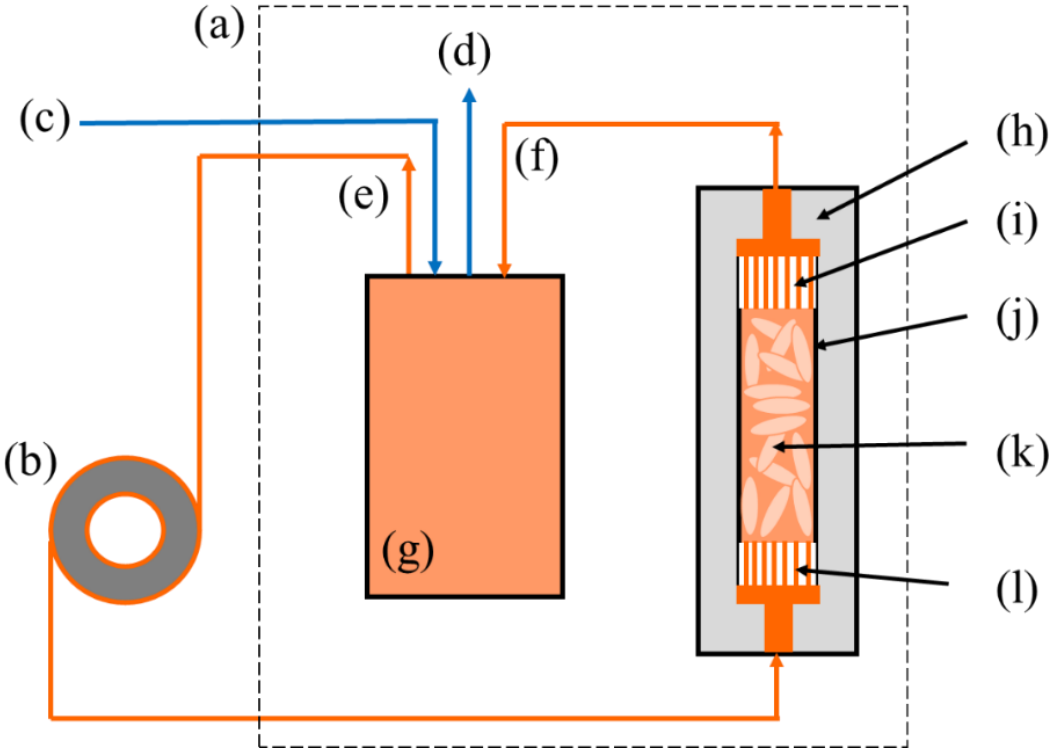


Figure 9 – Schéma du bioréacteur à perfusion. (a) incubateur 37°C, (b) pompe péristaltique, (c) entrée réservoir pour air à 5% ($mL.mL^{-1}$) de CO2, (d) échappement du réservoir, (e) sortie réservoir pour milieu de culture, (f) entrée réservoir pour recyclage du milieu de culture, (g) réservoir de milieu de culture, (h) chambre en polycarbonate, (i) grille poreuse à la sortie, (j) tube en polypropylène, (k) matrices d'hydrogel poreuses et cellularisées, (l) grille poreuse à l'entrée.

3) Prélèvement des matrices d'hydrogel perfusées

Le prélèvement des matrices perfusées s'effectue en arrêtant le débit de la pompe, puis en bloquant le retour de flux dans les tuyaux à l'aide de pinces à clamper. La chambre du réacteur est ouverte par le dessus, la grille supérieure est retirée et les matrices nécessaires sont prélevées à l'aide de pinces de chirurgie stériles, puis déposées dans des puits de plaque 24 puits (TTP®) pour leurs caractérisations futures. Ces étapes sont répétées en sens inverse pour poursuivre la perfusion des matrices restantes dans le bioréacteur. Cette méthode permet un suivi temporel partiellement destructif de l'empilement. Il est limité par le nombre de matrices prélevées et la fréquence de prélèvement.

4.4 Evaluation de la prolifération des cellules dans les matrices perfusées

On définit la prolifération comme l'augmentation d'une population de cellules en nombre. Une prolifération positive implique des cellules qui se divisent à un taux qui dépasse le taux de mortalité. Dans cette section les méthodes pour la quantification du nombre de cellules, la qualification de leur capacité à se diviser et leur viabilité/mortalité sont présentées.

1) Quantification du nombre de cellules dans les matrices

Fixation des cellules dans les matrices prélevées

Les matrices cellularisées et perfusées, puis prélevées et disposées dans des puits de plaque 24 puits sont fixées biologiquement dans 250 µL de PBS et 4% ($g.mL^{-1}$) paraformaldéhyde pendant 1h à température ambiante. Le formaldéhyde diffuse dans l'hydrogel, les pores et les membranes des cellules pour se fixer chimiquement sur la plupart des fonctions biologiques azotées, en particulier l'ADN, ce qui permet de bloquer toute activité biologique et de préservées en état les cellules. Ce composé est classé comme cancérigène (catégorie 1b) et mutagène (catégorie 2), il est donc manipulé avec précaution en respectant les règles de sécurités dédiées. Après fixation, les matrices sont rincées en plusieurs bains de 250 µL de PBS selon la méthode de deux bains rapide, suivis de 15 minutes de diffusion qui est répétée 3 fois.

Acquisitions par microscopie confocale

Les matrices sont analysées au microscope confocal (CLSM, LSM 700, Zeiss) de façon analogue au section 3.2.2 et 3.2.3. L'ensemble de la surface du plan basal XY des matrices est analysé sur 370 µm de profondeur en 26 coupes 2D de résolution 2,5 µm. Le canal vert correspond à l'hydrogel marqué FITC et le canal rouge aux cellules marquées PKH26. De plus, une tranche orthogonale dans le plan XZ est réalisée et analysée sur 250 µm de profondeur en 13 coupes 2D de résolution 2,5 µm.

Traitements d'images

Les cellules se présentent sous la forme d'amas. Le volume des amas est calculé par traitement d'images avec Fiji (ImageJ) après un seuillage, un filtre médian et l'utilisation du plugin 3D Object Counter. Le nombre de cellules par amas et le nombre de cellules dans le volume analysé sont estimés à l'aide du volume moyen d'une cellule MC3T3E1 (3000 μm^3, (Klembt Andersen et al., 2005)). Le nombre total de cellules dans la matrice est estimé par extrapolation au volume complet de la matrice.

Calcul de l'effet de filtre sur les cellules

L'effet de filtre défini à la section 3.2.3 est calculé sur une matrice d'hydrogel poreuse, cellularisée mais non-perfusée en discriminant les pores contenant des cellules de ceux qui n'en contiennent pas. L'hypothèse sous-jacente est que les cellules (ou amas de cellules) qui ont colonisé un pore lors de l'ensemencement (section 4.2) n'ont pas quitté ce pore lors de 24h d'incubation avant fixation.

2) Évaluation de la division cellulaire par immunofluorescence impliquant la protéine Ki67

Expression de la protéine Ki67

Les cellules qui se divisent passent successivement dans des phases biologiques G1 (préparation à S), S (duplication du génome), G2 (préparation à M) et M (mitose = division cellulaire) qui forme un cycle. Lors de ce cycle, la protéine Ki67 est exprimée au niveau de l'ADN, dans le noyau des cellules. Elle même sur-exprimée lors de la mitose. Au contraire, les cellules quiescentes (au repos) ou sénescente (en fin de vie) se trouvent dans la phase G0 où la protéine Ki67 n'est pas du tout exprimée.

Protocole de marque de Ki67 par immunofluorescence

Pour mettre en évidence les cellules proliférantes par immunofluorescence, l'anticorps polyclonal de lapin anti-Ki67 (ab15580) est utilisé comme anticorps primaire pour se fixer spécifiquement sur la protéine Ki67. On utilise ensuite un anticorps secondaire de singe anti-lapin Alexa Fluo® 647 nm (ab150075) fluoresçant dans le rouge pour se fixer spécifiquement sur l'anticorps primaire de lapin. Il s'agit d'un marquage doublement spécifique par cascade d'anticorps.

Les cellules contenues dans les matrices d'hydrogel poreuses sont perméabilisées avec 250 µL de PBS et Triton X à 0,1% ($mL.mL^{-1}$) pendant 3 fois 30 minutes, puis la matrice est rincée 3 fois dans du PBS. Les matrices sont incubées à 4°C pendant 24h en présence de 250 µL de PBS contenant l'anticorps anti-Ki67 (concentration finale de 8 $\mu g.mL^{-1}$). Les matrices sont rincées 3 fois dans du PBS et incubée à température ambiante dans 250 µL de PBS contenant 4 $\mu g.mL^{-1}$ d'anticorps secondaire pendant 30 minutes. Les matrices sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS.

Identification du noyau des cellules

Dans cette expérience, les cellules n'ont pas été marquées par le PKH26 (section 4.2), fluoresçant dans le rouge pour éviter la confusion avec l' Alexa Fluo® 647 nm. Le noyau de toutes les cellules est marqué après incubation à température ambiante dans 250 µL de PBS contenant 1 $\mu g.mL^{-1}$ de DAPI (ThermoFisher) pendant 30 minutes. Les matrices sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS. L'analyse au microscope confocal (CSLM) permet d'obtenir le noyau des cellules sur le canal bleu et le noyau des cellules exprimant Ki67 sur le canal rouge.

3) Quantification de la viabilité des cellules par double marquage fluorescent

Principe de la méthode Live/Dead

Le kit Live/Dead (Invitrogen™) a été utilisé pour caractériser les cellules vivantes et mortes dans les matrices d'hydrogel. Le kit contient de la calcéine AM qui diffuse dans les cellules et devient fluorescente (vert) après hydrolyse de ses fonctions ester par les enzymes estérases des

cellules vivantes. Le kit possède un second marqueur, l'homodimère-1 d'éthidium fluoresçant dans le rouge qui diffuse uniquement à travers les membranes perméables des cellules mortes. Ce kit permet un double marquage de viabilité et de mortalité.

Protocole de quantification de la viabilité et de la mortalité

Les cellules ne sont pas marquées au PKH26 (rouge) pour l'analyse de mortalité et les matrices ne possède pas de dextrane-FITC (vert) pour l'étude de viabilité. Les matrices cellularisées et perfusées sont rincées 1 fois dans du PBS, puis incubées dans les conditions standards de culture pendant 30 minutes en présence de 250 µL de milieu α-MEM complet contenant 2 $\mu mol.L^{-1}$ de calcéine AM et 5 $\mu mol.L^{-1}$ d'homodimère-1 d'éthidium. Les matrices sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde comme décrit dans la section 4.4, paragraphe 1).

5. Modélisation des conditions hydrodynamiques et nutritives des cellules dans les matrices d'hydrogel perfusées en bioréacteur

5.1 Modélisation de l'écoulement hydrodynamique dans la macroporosité du bioréacteur

La modélisation de l'écoulement inclut une définition des phases fluides et solides (matrices d'hydrogel) fondée sur un bioréacteur expérimental et la simulation numérique d'un écoulement qui satisfait les conditions limites imposées par la pompe.

5.1.1 Acquisition de la macroporosité du bioréacteur par IRM

La macroporosité du bioréacteur est l'espace entre les matrices d'hydrogels qui est accessible à l'écoulement du fluide. Cette section présente le protocole pour obtenir une description 3D avec une résolution finale de $(55\ \mu m)^3$. Cette résolution est bon compromis de précision pour le calcul numérique de l'écoulement dans le bioréacteur suivant Thibeaux et al (2019).

1) Préparation de l'échantillon

On considère le bioréacteur réduit à l'ensemble du tube en PP rempli de matrices d'hydrogel poreuses contraintes entre deux grilles en entrée et en sortie. Cet ensemble est placé dans un tube à centrifuger de 15 mL (TTP®) qui est rempli de PBS pour avoir un milieu homogène qui facilitera l'acquisition par IRM. Un soin particulier est apporté à éliminer les bulles d'air, sources d'artefacts, grâce à des cycles de dépressurisation à l'aide d'une cloche à vide. Le tube est analysé par IRM 7 Tesla (Pharmascan 70/16, Bruker, Hôpital Bichat, Paris) piloté via le logiciel ParaVision® pour l'acquisition. Le tube est fixé à la nacelle pour rongeurs de type rat avec l'axe du tube dans l'axe du banc de l'IRM. L'antenne volumique de 40 mm pour corps de souris est calibrée en fréquences.

2) Acquisitions IRM

Une séquence pondérée par la relaxation T2 (transversale) du spin est choisie pour faire apparaître en hyper signal (gris clair) l'eau libre (= le fluide) et en hypo signal (gris foncé) l'eau liée (= l'hydrogel). Le protocole est de type « T2-turbo-RARE » avec facteur de 8 et une moyenne réalisée sur 2 images. 135 tranches transversales (perpendiculaire à l'axe du tube) d'épaisseur 250 µm sont définies avec un maillage 310*310 de 55 µm de résolution optimale. Le temps d'écho T_E est optimisé à 60 ms pour un meilleur contraste et le temps T_R est choisie le plus court possible à 17 285 ms tout en étant suffisamment long pour permettre une pondération T2. L'acquisition dure 35 minutes et est reproduite après un décalage de 125 µm des 135 tranches transverses dans l'axe du tube.

3) Traitements d'images

La reconstruction avec ImageJ de l'empilement des tranches permet une définition transverse de 125 µm qui résulte de l'alternance des deux acquisitions. Une interpolation permet ensuite de définir des tranches de 55 µm et donc un volume avec une résolution 3D de 55 µm. Après traitement d'image, selon un filtre moyen non-local et un seuillage, une segmentation du bioréacteur est réalisée en : 1) le fluide 2) les matrices hydrogel 3) les parois du tube en PP.

5.1.2 Simulation de l'écoulement hydrodynamique dans le bioréacteur par Méthode de Boltzmann sur Réseau

On peut raisonnablement considérer que le liquide de culture a un comportement newtonien (viscosité dynamique à 37°C estimée à $\mu = 10^{-3}$Pa.s (Lakhotia and Papoutsakis, 1992)). Dans ce cas, l'écoulement dans le bioréacteur est décrit par les équations de Navier-Stokes. Les parois du réacteur, les matrices d'hydrogel et les amas de cellules sont assimilés à des solides imperméables : la vitesse du fluide s'annule à l'interface solide/fluide. On suppose qu'il n'y a pas d'écoulement dans la microporosité des matrices, seule la macroporosité du réacteur (associée à l'empilement des matrices) est accessible à l'écoulement. Les équations de Navier-Stokes sont simulées par une méthode de Boltzmann sur réseau (LBM, Lattice-Boltzmann Method) à multiples temps de relaxation (MRT, Multi-Relaxation-Time) avec un réseau cubique à 19 vitesses (D3Q19) (d'Humières, 2002). L'implémentation de la méthode est présentée en détails dans la thèse de Rivière (2005) et dans Thibeaux et al. (2019). Par la suite, nous rappelons brièvement le principe général de la méthode et nous rapportons les paramètres des simulations.

Dans la méthode LB, le fluide est décrit par une population de particules fictives. Le nombre de vitesses accessibles à chaque particule est fini (ici 19 vitesses). À chaque pas de temps, la population de particules évolue en deux étapes : propagation des particules d'un nœud au nœud voisin en fonction de leur vitesse puis collision entre particules d'un même nœud. La vitesse hydrodynamique du fluide réel correspond au moment d'ordre 1 de la fonction de distribution des vitesses des particules fictives. Plus généralement, LBM est construite pour que le comportement macroscopique des particules fictives coïncide avec le comportement macroscopique d'un fluide réel.

L'opérateur de collision qui s'applique à la fonction de distribution des vitesses fait intervenir deux paramètres de relaxation. Le premier paramètre, s_1, est directement relié à la viscosité cinématique $\nu = \mu/\rho$ du fluide réel ($\rho = 993$ kg.m^{-3}):

$$s_1 = \left(\frac{\nu}{c_s^2}\frac{\Delta t}{\Delta x^2} + \frac{1}{2}\right)^{-1} \tag{19}$$

où c_s est la vitesse du son associée à la méthode de Boltzmann sur réseau ($c_s^2 = 1/3$ en unités réseau), Δx est le pas du réseau (en unités réelles) et Δt est le pas de temps (en unités réelles). Le second paramètre, s_2, est lié à s_1 par l'intermédiaire de la relation (8) dite « magique » :

$$s_2 = 8\frac{2 - s_1}{8 - s_1} \tag{20}$$

Lorsque cette relation est satisfaite, on minimise l'erreur associée à la position de l'interface fluide/solide : lorsqu'on utilise la règle dite de « rebond simple » pour gérer la réflexion des particules sur les parois solides, l'interface réelle se trouve à égale distance entre les nœud fluides et les nœuds solides (Ginzburg and d'Humières, 2003). Enfin, le pas de temps est choisi de manière à limiter le caractère intrinsèquement compressible de LBM. Pour ce faire, on choisit :

$$dt = 0{,}06\,\Delta x / v_{max} \tag{21}$$

où v_{max} est la vitesse locale maximale atteinte par le fluide dans le système.

À titre d'exemple, on simule l'écoulement du milieu de culture dans un tronçon cylindrique de 6,55 mm de hauteur, extrait de l'un des bioréacteurs analysés par IRM. La vitesse en fût vide est égale à $V_d =$ 1,47 mm.s^{-1}. Le nombre de Reynolds, basé sur la perméabilité K de l'empilement de matrices, est estimé à $Re_K = \rho V_d K^{1/2}/\mu = 0{,}1$ (une approximation de la perméabilité, $K \cong 5 \times 10^{-3}$ mm^2, est donnée par la loi de Carman-Kozeny (Carman, 1939)). Le régime d'écoulement est donc essentiellement darcéen (Nield and Bejan, 2006). Le tronçon de bioréacteur est discrétisé en $n_x \times n_y \times n_z = 220 \times 220 \times 149$ nœuds. Le pas du réseau est égal à 55 µm. Le pas de temps est fixé par la relation (9) où la vitesse maximale est estimée à $v_{max} = 40\,V_d$.

Le calcul est amorcé en régime de Stokes pendant 100 000 itérations. Puis les termes non linéaires sont pris en compte. Le champ de vitesse convergé est obtenu après 120 000 autres itérations en temps. Les résultats sont ensuite exportés et analysée à l'aide du logiciel Tecplot (Tecplot 360 EX 2016).

5.2 Modélisation de l'état stationnaire de concentration en nutriment dans le bioréacteur

La modélisation de l'état stationnaire de concentration en nutriment nécessite une modélisation du champ des vitesses (section 5.1) et une définition des phases fluides, phases matériaux (matrices d'hydrogel) et tissu biologique (les cellules) qui correspondent à un bioréacteur expérimental. La simulation numérique de l'état stationnaire doit satisfait les conditions aux limites du bioréacteur.

5.2.1 Mesure du coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel

1) Description du dispositif expérimental

Un dispositif expérimental dédié a été conçu pour mesurer le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel (**Figure 10**), il est inspiré du dispositif de Hulst et al. (1989). Le dispositif comporte un réacteur cylindrique (**Figure 11**) en PMMA transparent de 3,6 cm de diamètre intérieur de 7,7 cm de longueur, pour un volume utile V_r = 84 mL, agité par un barreau aimanté à 400 tour.min^{-1}. Le réacteur possède une entrée équipée d'une vanne quart-de-tour à sa base en PVC et une sortie dans sa tête en PVC. L'étanchéité du réacteur est assurée par un système de serrage à vis et joint plat. Un dispositif de tubes flexibles compatibles avec des raccords automatiques de 6 mm de diamètre extérieur (Legris®) permet une circulation de PBS jusqu'au réacteur à l'aide d'une pompe péristaltique (AxFlow). Le PBS est supplémenté avec 1% (mL.mL^{-1}) d'antibiotique Pénicilline-Streptomycine (**Tableau 2**) pour éliminer la respiration bactérienne. Une réserve de 500 mL de PBS est agitée et en équilibre avec l'air (100%^{sat}). L'ensemble du dispositif est régulé en température par immersion dans un bain marie thermostaté à 37°C.

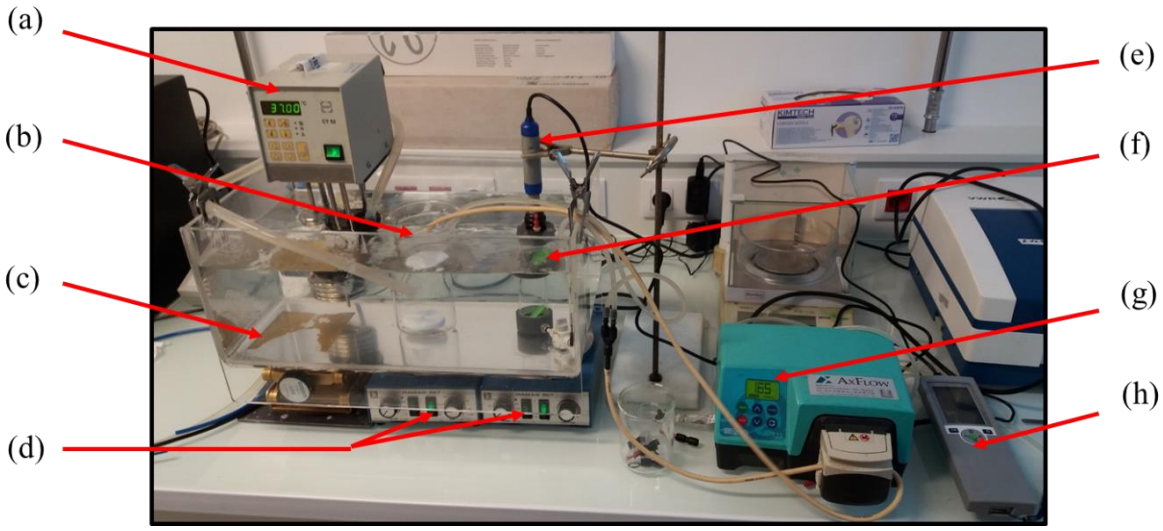


Figure 10 – Dispositif expérimental pour la mesure du coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel. (a) régulateur en température, (b) réserve de PBS, (c) bain thermostaté à 37°C, (d) agitateurs magnétiques, (e) sonde optique pour oxygène dissous, (f) réacteur, (g) pompe péristaltique, (h) boîtier d'acquisition.

Le réacteur est équipé d'une sonde optique d'oxygène dissous (OptiOx, inLab®) par mesure de fluorescence qui est reliée à un boitier d'acquisition (Seven2Go™) géré par le logiciel Easy Direct Ph®. Le choix d'une sonde optique a été motivé par le besoin de ne pas consommer d'oxygène lors de la mesure, par opposition aux sondes galvaniques, par exemple. La sonde mesure en continue (toutes les 6 secondes) la concentration en oxygène dissous dans le fluide de la chambre principale du réacteur. La chambre principale est située au-dessus d'une chambre secondaire de diamètre 3 cm où un disque d'hydrogel de diamètre d = 3 cm et d'épaisseur e = 4,5 mm rempli tout l'espace latéral disponible. Une grille imprimée en 3D par extrusion

d'un filament (Eastman Amphora™ 3D Polymer AM3300), d'épaisseur de 2 mm et perforée de motifs carrés de 5 mm, permet la communication du fluide entre la chambre principale et l'hydrogel.

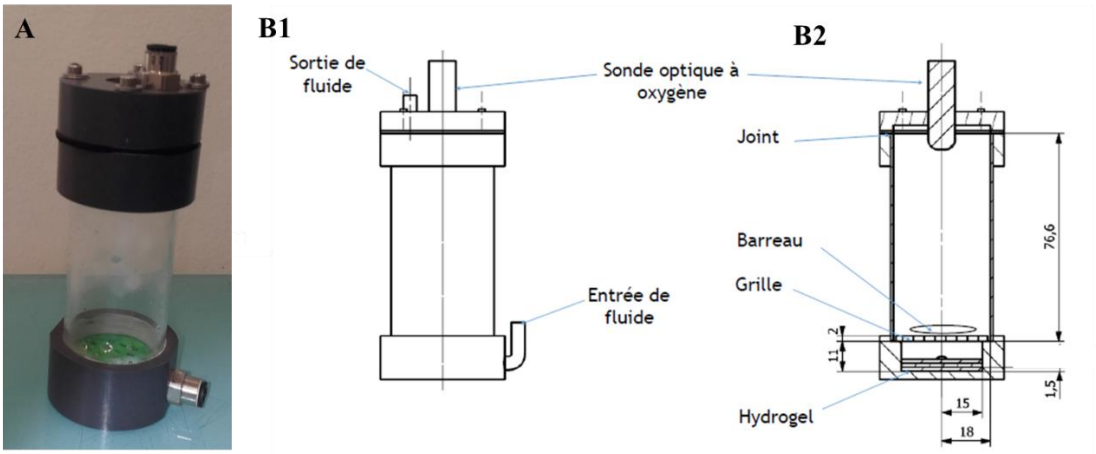


Figure 11 – Réacteur pour la mesure du coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel. **A** : Photographie du réacteur. **B** : Schéma réalisé par Christos Annick Angijiro et Clément Civrais, élèves de master que j'ai eu l'occasion d'encadrer, **B1** : représentation du réacteur **B2** : côtes techniques du réacteur.

2) Protocole expérimental

L'expérimentation consiste en une mesure indirecte du flux expérimental d'oxygène qui traverse l'hydrogel pour calibrer un modèle de diffusion dépendant de D_o ($m^2.s^{-1}$), le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel. Pour ce faire, une augmentation brusque (échelon) de la concentration en oxygène est imposée dans la chambre principale agitée et la mesure de la décroissance de la concentration en oxygène dans la chambre permet de déduire le flux d'oxygène à travers l'hydrogel.

En pratique, un dégazage de l'oxygène dissous dans le réacteur est réalisé par bullage d'azote pendant 30 minutes. Les bulles sont chassées grâce à l'apport de PBS depuis la réserve via la pompe et le réacteur est hermétiquement scellé. Après 20 minutes, la chambre principale et la chambre secondaire sont en équilibre à une concentration en oxygène basse, typiquement moins de $10\%^{sat}$. L'échelon de concentration est imposé par pompage à 100 $tour.min^{-1}$ pendant 30 secondes de 200 mL de PBS de la réserve qui est maintenu à $100\%^{sat}$ par agitation. Ces opérations sont réalisées rapidement grâce aux raccords automatiques et à la vanne quart-de-tour de sorte à négliger les perturbations de la concentration d'oxygène dans l'hydrogel. Le réacteur est ensuite hermétiquement scellé et la décroissance de la concentration en oxygène dissous dans la chambre est enregistrée par la sonde.

3) Détermination du coefficient de diffusion D_o et du coefficient de partage K

On se rapporte au cas de la diffusion d'un soluté depuis un volume fixe et parfaitement agité dans une tranche de solide modélisé par Carman et Haul (1954). La configuration exacte est celle d'une tranche d'épaisseur L dont les deux faces sont exposées au fluide. Dans le dispositif expérimental, l'hydrogel d'épaisseur e est en contact avec le fluide sur sa face supérieure uniquement, avec une condition de flux nul sur sa face inférieure et ses faces latérales. Le volume de l'hydrogel vaut $V_h = \pi\, e \left(\frac{d}{2}\right)^2$.

L'évolution de la concentration en oxygène dissous dans le réacteur, c(t) est décrite par une expression simplifiée :

$$\ln\left(\frac{\mathrm{c(t)} - c_\infty}{c_2 - c_\infty}\right) \cong \ln\left(\frac{2(1+\Lambda)}{1+\Lambda+q_1^2\Lambda^2}\right) - \frac{q_1^2 D_o t}{e^2} \tag{22}$$

avec Λ, le facteur de répartition qui se calcule comme :

$$\Lambda = \frac{c_\infty - c_1}{\mathrm{c}_2 - c_\infty} \tag{23}$$

avec q_1, la première racine non nulle de l'équation :

$$\tan q + \Lambda\, q = 0 \tag{24}$$

où K est le coefficient de partage entre l'oxygène dans l'hydrogel et dans le PBS.

On en déduit :

$$K = \frac{\mathrm{V_r}}{\mathrm{V_h}}\frac{1}{\Lambda} \tag{25}$$

L'équation (22) est valide sous les hypothèses (i) $\Lambda > 0{,}4$, c'est-à-dire pour un ratio de volume $\frac{\mathrm{V_r}}{\mathrm{V_h}}$ suffisamment grand et (ii) lorsque $c(t) < 0{,}45\,(c_2 - c_\infty)$, c'est-à-dire après un temps t suffisamment long. Ces deux hypothèses sont vérifiées dans les résultats du Chapitre V à la section 3.3. Par régression linéaire, l'équation (22) permet d'obtenir une estimation de D_o à partir des points de mesures c(t). La concentration d'équilibre de l'oxygène dans l'hydrogel est $K\, \mathrm{c}_\infty$.

5.2.2 **Description de la phase cellulaire dans les matrices d'hydrogel perfusées**

L'enjeu de cette section est la mise au point d'un protocole pour l'acquisition de la phase cellulaire (diamètre d'une cellule de l'ordre de 10^{-5} m) dans le bioréacteur à perfusion (ordre de taille de 10^{-2} m). Une première approche a consisté en une acquisition par IRM de la macroporosité du bioréacteur et de la phase cellulaire en simultané à l'échelle du bioréacteur. Une seconde approche a reposé sur l'acquisition par microscopie (CLSM) de la phase cellulaire à l'échelle d'une matrices poreuses, extrapolée à l'ensemble de l'empilement du bioréacteur.

1) Acquisition par IRM de la phase cellulaire dans le bioréacteur

Augmentation du signal IRM des cellules grâce à des SPION

On utilise des nanoparticules d'oxyde de fer super-paramagnétique (« SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles », SPION) pour augmenter le contraste en IRM des cellules vers un hyposignal prononcé : noir en pondération T2. Une collaboration avec l'équipe de Iwona Chicha, chercheur à l'Université d'Erlangen en Allemagne, a permis d'obtenir des lots de SPION-LA-HSA.

Les SPION-LA-HSA ont été synthétisées par précipitation de sels de fer II et fer III et comportent une couche d'acide laurique (« Lauric Acid ») et d'albumine d'humaine (« Human Serum Albumin ») (Poller et al., 2017). Le cœur super-paramagnétique mesure 20 à 30 nm et le diamètre hydrodynamique mesurée par DLS est de 74,44 nm en comptant la couche organique LA-HSA. Cette couche a pour but de stabiliser la suspension de SPION et d'augmenter la biocompatibilité jusqu'à 200 µg de fer par cm^2 de boîte de culture ($\mu g_{[Fe]}.cm^{-2}$).

Les cellules MC3T3-E1 sont ensemencées (7 500 cellules par cm^2) dans une boîte de culture T75 (75 cm^2) de sorte à atteindre 70% de confluence après 72h. Le milieu de culture est remplacé 24h après ensemencement par 8 mL de milieu α-MEM complet et 20 $\mu g_{[Fe]}.cm^{-2}$ de SPION-LA-HSA pendant 36h. Puis le milieu est rincé avec du PBS puis remplacé par du milieu α-MEM complet pour les 12 heures de culture suivantes. Les cellules sont ensuite décollées et ensemencées dans des matrices d'hydrogel poreuses à raison de 100 000, 300 000 et 600 000 cellules par matrice (voir section 4.2). Les matrices sont placées dans des tubes à centrifuger de 2 mL (Eppendorf) dont les volumes sont remplis de PBS et analysées sous IRM 7 Tesla (Pharmascan 70/16, Bruker).

Acquisition simultanée de la macroporosité et de la phase cellulaire

Une première séquence T2-turbo-RARE de 18 minutes est réalisée dans les conditions décrites à la section 5.1.1 sur 60 tranches de 250 µm avec une résolution de $(55\mu m)^2$ correspondant à la résolution optimale pour la macroporosité. Par traitement d'image (Fiji, ImageJ), après seuillage des niveaux de gris pour isoler les cellules, le volume des cellules est quantifié avec le plugin 3D Object Counter.

Dans le but de quantifier la concentration des SPION sur une unique tranche de 250 µm d'épaisseur et $(55\mu m)^2$ de résolution, une seconde séquence est réalisée par relaxométrie T2*-MSME (Multi-Slice-Mutli-Echo). Le temps d'écho minimal est de 13,845 ms et le nombre de temps d'écho T_E est de 11 avec un espacement de 13,845 ms. Le temps de répétition T_R est de 2 000 ms. Une moyenne est effectuée sur 4 images pour 1h d'acquisition. Une calibration de la décroissance du signal, *S* permet d'estimer le coefficient T_2^* selon l'équation proposé par Milford (2015) :

$$S(T_E) = \text{offset} + k \cdot S_0 \cdot \exp\left(\frac{-T_E}{T_2^*}\right) \tag{26}$$

avec S_0, la concentration de proton et k, un facteur de proportionnalité et offset, une constante introduite par Milford (2015) pour une meilleur calibration de T_2^*. En pratique, le produit $k\,S_0$ est calibrée en parallèle de T_2^* et l'offset est mesuré comme la moyenne des trois derniers signaux.

2) <u>Acquisition par CLSM de la phase cellulaire à l'échelle d'une matrice et extrapolation au bioréacteur.</u>

Une matrice d'hydrogel poreuse et cellularisée après ensemencement de 600 000 cellules (voir section 4.2) est analysé au microscope confocal (CLSM) en 26 couches de 14,2 µm avec une résolution de 2,5 µm. La taille des amas est obtenue par traitement d'images avec Fiji (ImageJ, section 4.4). La distribution cumulée de taille est calibrée par une fonction de répartition de la loi exponentielle :

$$F(x) = 1 - e^{-\lambda(x - x_{min})} \tag{27}$$

L'acquisition de l'empilement de matrices d'hydrogel poreuses dans le bioréacteur complet obtenue à la section 5.1.1 est aléatoirement ensemencée d'amas cellules en extrapolant les résultats de la matrice d'hydrogel analysée au CLSM. La position des amas résulte d'un tirage aléatoire suivant une loi uniforme dont la densité permet de reproduire le nombre mesuré de cellules par matrices. La taille des amas est tirée aléatoirement en suivant la fonction de répartition exponentielle (27).

5.2.3 **Simulation de l'état stationnaire de concentration en oxygène dans le bioréacteur par Méthode de Boltzmann sur Réseau**

La simulation de la concentration en nutriment est effectuée avec une méthode de Boltzmann sur réseau. Le code est développé en Fortan 90. Les équations de convection-diffusion sont

simulées par la méthode à deux temps de relaxation proposée par Ginzburg (2017) avec le schéma D3Q7.

1) Définitions du modèle biologique

Le transport d'oxygène dans le bioréacteur est décrit par l'équation de convection-diffusion. Le dioxygène dissous étant très dilué dans le fluide, il est raisonnable de décrire le flux diffusif à l'aide de la loi de Fick. En outre l'équation locale de conservation du dioxygène fait intervenir un terme source (à valeur négative ou nulle) correspondant à la consommation de l'oxygène par les cellules. Ce terme est modélisé par la loi de Michaelis-Menten qui s'écrit par unité de volume et de temps :

$$\varphi = \frac{V_m}{\vartheta}\frac{c}{c + K_m} \tag{28}$$

c est la concentration locale en dioxygène dissous (mol.m^{-3}), V_m est la vitesse maximale de consommation de l'oxygène, K_m est la constante de Michaelis-Menten, c'est-à-dire la concentration pour laquelle la consommation diminue de moitié par rapport à V_m. À défaut de données concernant les ostéoblastes MC3T3E1, les constantes sont choisies pour des fibroblastes : V_m = 4 10^{-17} mol.cell^{-1}.s^{-1} (Kunz-Schughart et al., 2000) et K_m = 6 10^{-3} mol.m^{-3} (Cho et al., 2007). Le volume d'une cellule MC3T3E1 est $\vartheta = 3\,000$ µm^3 (Klembt Andersen et al., 2005).

Le coefficient de diffusion de l'oxygène dissous dans le fluide est assimilé à celui dans l'eau pure à 37°C, D = 3,0 10^{-9} m^2.s^{-1}. Dans l'hydrogel, le coefficient de diffusion est égal à la valeur mesurée D_o. On suppose que le coefficient de diffusion de l'oxygène dans les cellules est égal à D_o. Les coefficients de partage de l'oxygène entre le fluide et l'hydrogel ainsi qu'entre l'hydrogel et les cellules sont supposés égaux à 1.

2) Mise en équations grâce aux densités de gaz sur réseau

L'équation de convection-diffusion est simulée par une méthode de Boltzmann sur réseau à deux temps de relaxation (TRT, Two-Relaxation-Time) avec un réseau cubique à 7 vitesses (D3Q7) proposée par Ginzburg (2017).

Conformément à la littérature, les grandeurs utilisés pour présenter la méthode LB sont exprimées en unités réseau (voir la correspondance avec les grandeurs réelles dans le **Tableau 5**), c'est-à-dire adimensionnées à l'aide du pas du réseau Δx, du pas de temps Δt et d'une concentration de référence c_0. c_0 est choisi égale à la concentration d'oxygène dans l'eau à l'équilibre avec l'air à 37°C et 1 bar de pression.

De façon analogue au fluide dans le paragraphe précédent (2.7), l'oxygène dans la bioréacteur est décrit à l'aide de particules fictives, distribuées sur les nœuds d'un réseau repérés par leur

vecteur position $\boldsymbol{r}$. L'espace des vitesses de particule comprend le vecteur nul $\boldsymbol{c}_0$ et $(Q-1) = 6$ vecteurs connectant chaque nœud du réseau cubique à ses six premiers voisins. Chaque vecteur vitesse $\boldsymbol{c}_q$ a son opposé $\boldsymbol{c}_{\bar{q}}$. La population f_q de particules ayant la vitesse $\boldsymbol{c}_q$ est décomposée en une composante symétrique et une composante antisymétrique : $f_q^+ = ½\,(f_q + f_{\bar{q}})$ et $f_q^- = ½\,(f_q - f_{\bar{q}})$ respectivement. L'équation d'évolution de la fonction de distribution des vitesses s'écrit :

$$f_q(\boldsymbol{r}+\boldsymbol{c}_q, t+1) = f_q(\boldsymbol{r}, t) - s^+\left(f_q^+ - e_q^+\right) - s^-\left(f_q^- - e_q^-\right) \tag{29}$$

s^+ et s^- sont les paramètres de relaxation des parties symétrique et antisymétrique. s^- dépend du coefficient de diffusion D (en unités réelles) du soluté (dioxygène) dans le milieu (fluide, hydrogel ou amas cellulaire) :

$$\mathrm{s}^- = \left(\frac{D\Delta t}{\mathrm{c_e}\,\Delta x^2} + \frac{1}{2}\right)^{-1} \tag{30}$$

c_e est le paramètre d'échelle du coefficient de diffusion. Pour D3Q7, il doit être dans l'intervalle $]0; 1/3]$. Il est ici fixé à $c_e = 1/4$.

Le paramètre de relaxation s^+ est fixé de manière à satisfaire la relation « magique » :

$$\left(\frac{1}{s^+} - \frac{1}{2}\right)\left(\frac{1}{s^-} - \frac{1}{2}\right) = \frac{1}{4} \tag{31}$$

Dans ce cas, la stabilité de la méthode LB est optimale (Ginzburg et al., 2010)

3) <u>Définition de la concentration à partir des fonctions d'équilibre</u>

e_q^+ et e_q^- sont respectivement la partie symétrique et la partie antisymétrique de la fonction de distribution d'équilibre (vers laquelle relaxe la fonction de distribution des vitesses). Pour le schéma D3Q7, e_q^+ et e_q^- sont données par:

$$e_q^+ = \frac{1}{2}C\left(c_e U_\alpha^2 c_{q\alpha}^2\right) + \frac{\mathcal{S}_q}{s^+}\,, \qquad e_q^- = \frac{1}{2}C U_\alpha c_{q\alpha}\,,\ \text{pour } q = 1{,}6 \tag{32}$$

$$e_0^+ = C(\boldsymbol{r}, t) - 2\sum_{q=1}^{3} e_q^+(\boldsymbol{r}, t) + \frac{\mathcal{S}(\boldsymbol{r}, t) - \sum_{q=1}^{6}\mathcal{S}_q}{s^+}\,, \qquad e_0^- = 0 \tag{33}$$

en adoptant la convention d'Einstein (somme implicite sur les indices répétés). $\boldsymbol{U}(\boldsymbol{r}, t) = \{U_\alpha, \alpha = 1{,}3\}$ est la vitesse macroscopique du fluide au nœud. $\alpha = 1{,}3$ correspond aux 3

directions X, Y et Z respectivement. $C(\boldsymbol{r},t)$ est la concentration « microscopique » donnée par :

$$C(\boldsymbol{r},t) = \sum_{q=0}^{6} f_q(\boldsymbol{r},t) \tag{34}$$

$\mathcal{S}(\boldsymbol{r},t)$ est le terme source lié à la consommation des cellules. $\mathcal{S}_q = c_e\mathcal{S}/2$ est sa distribution pour $q = 1{,}6$.

La concentration macroscopique C_m en oxygène est obtenue à partir de la concentration microscopique C à laquelle on doit ajouter un terme correctif :

$$C_m(\boldsymbol{r},t) = C(\boldsymbol{r},t) + \frac{\mathcal{S}(\boldsymbol{r},t)}{2} \tag{35}$$

4) Stabilité et critère de convergence

Sachant que pour un écoulement uniforme de vitesse $\mathcal{U}$, la condition de stabilité de la méthode LB D3Q7 est donnée par $\mathcal{U}^2 \leq \min[1-3c_e, 3c_e/2]$ (Ginzburg, 2017; Ginzburg and d'Humières, 2003), on déduit la condition nécessaire (mais non suffisante) que doit satisfaire Δt dans le cas d'un écoulement quelconque (avec $c_e = 1/4$) :

$$\Delta t \leq \frac{\Delta x}{2v_{max}} \tag{36}$$

où v_{max} est la vitesse locale maximale atteint par le fluide dans le domaine, exprimée en unités réelles.

Grandeur	**réelle**	**en unités réseau**	**Référence**	**Unités**
Concentration	c	C_m	c_0	mol.m^{-3}
Vitesse du fluide	v	U	$\Delta x/\Delta t$	m.s^{-1}
Terme source volumique	φ	$\mathcal{S}$	$c_0/\Delta t$	mol.m^{-3}.s^{-1}

Tableau 5 – Correspondance entre grandeurs réelles et grandeurs exprimées en unités réseau. On indique les grandeurs de référence utilisées pour l'adimensionnement ainsi que leurs unités.

On cherche à calculer le champ de concentration en régime stationnaire. La méthode de Boltzmann sur réseau étant intrinsèquement instationnaire, le champ de concentration calculé à l'instant t constitue une bonne estimation du champ stationnaire à condition que t soit

suffisamment grand. La convergence vers le régime stationnaire est estimée en calculant l'écart relatif (en norme L_2) entre deux champs de concentrations espacés de 1 000 pas de temps :

$$err^2 = \frac{\sum_{\vec{r}}\left(C_m(\boldsymbol{r},t) - C_m(\boldsymbol{r},t-1\,000\,)\right)^2}{\sum_{\vec{r}}\left(C_m(\boldsymbol{r},t)\right)^2} \tag{37}$$

Les simulations sont conduites sur un nombre d'itérations temporelles n_{it} suffisant pour satisfaire les critères suivants :

$$n_{it} \geq \frac{\ell^2}{D\Delta t} \text{ et } err \leq 10^{-10} \tag{38}$$

où ℓ est la longueur caractéristique du milieu où le transport est purement diffusif (dans l'hydrogel).

Après convergence, les résultats sont exportés et analysés à l'aide du logiciel Tecplot (Tecplot 360 EX 2016).

Chapitre III

Résultats – 1ère Partie

Mécanismes de formation des pores lors de la lyophilisation d'un hydrogel réticulé

Préambule

D'après la revue bibliographique de cette thèse les matrices d'hydrogel poreuses sont des biomatériaux de choix pour l'ingénierie tissulaire. Leur mise en forme s'effectue lors de la lyophilisation par le procédé de « ice-templating ». Bien que la lyophilisation de suspensions colloïdales, par exemple de collagène, soit déjà décrite dans la bibliographie scientifique, il manque une analyse des mécanismes de mise en forme des hydrogels obtenus par réticulation avant lyophilisation. Ce chapitre se concentre sur les mécanismes de mise en forme de la porosité des matrices d'hydrogel réticulé PUDNA 3% décrite au Chapitre II, à la section 1. L'originalité des résultats réside également dans les méthodes de pointes employées pour caractériser l'hydrogel solidifié par cryo-microscopie électronique et l'hydrogel lyophilisé par tomographie à rayon X.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis le 5 février 2019 et accepté pour publication après révision le 28 mai 2019 dans le journal *Acta Biomaterialia* sous la référence suivante :

Grenier, J., Duval, H., Barou, F., Lv, P., David, B., & Letourneur, D. (2019). Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying. *Acta Biomaterialia*, *94*, 195–203. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.070

Ce chapitre reprend le contenu de l'article en anglais et est complété par des annexes en français qui approfondissent l'étude de la solidification de l'hydrogel lors de la germination.

Les coquilles suivantes ont été directement corrigées dans cette version :
1) «The swelling volume ratio is defined as $Q = 1/v_{2s}$. » au lieu de «$Q = v_{2r}/v_{2s}$. »
2) Dans l'équation (2), « G »au lieu de « G' ».

Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffold textured by freeze-drying

Jérôme Grenier [a, b, c], Hervé Duval [a, *], Fabrice Barou [d], Pin Lv [a], Bertrand David [b, 1] and Didier Letourneur [c, 1]

[a] Laboratoire LGPM, CentraleSupélec, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, 91190, France

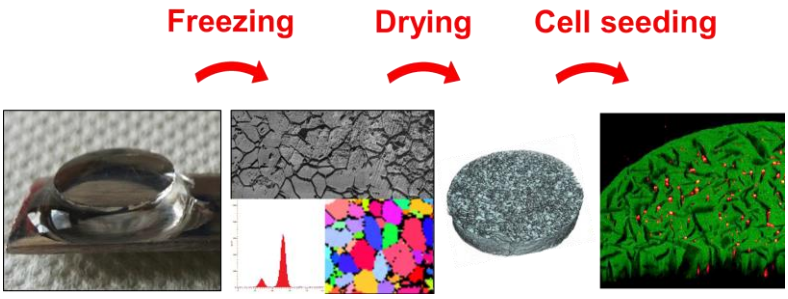
[b] Laboratoire MSSMat, UMR 8579 - CentraleSupélec, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, 91190, France

[c] INSERM 1148, LVTS, Université Paris 13, Université Paris Diderot, Hôpital Bichat, Paris, 75018, France

[d] Géosciences Montpellier, UMR 5243, Université Montpellier, CNRS UMR 52432, 34095 Montpellier cedex 05, 34095, France

[*] Corresponding author: herve.duval@centralesupelec.fr
[1] equal last authors

Graphical abstract



Keywords

Polysaccharide-based hydrogel; Ice-templating; Freeze-drying; Porous scaffolds; 3D cell culture

The rest of this chapter is subject to a temporary embargo for online publication rights related to the publication of the results in a peer reviewed scientific journal. Please contact the author of this thesis to request a copy for personal use only.

6. Annexes : solidification de l'hydrogel de polysaccharides réticulés en surfusion

6.1 Estimation des vitesses de front de solidification

Pour des hydrogels accolés (PUDNA 3%) l'observation directe de la solidification après germination est possible grâce au changement d'opacité des hydrogels. Un front de solidification correspondant à la séparation entre le matériau translucide en surfusion et le matériau opaque en cours de solidification est facilement identifiable (**Figure 7**).

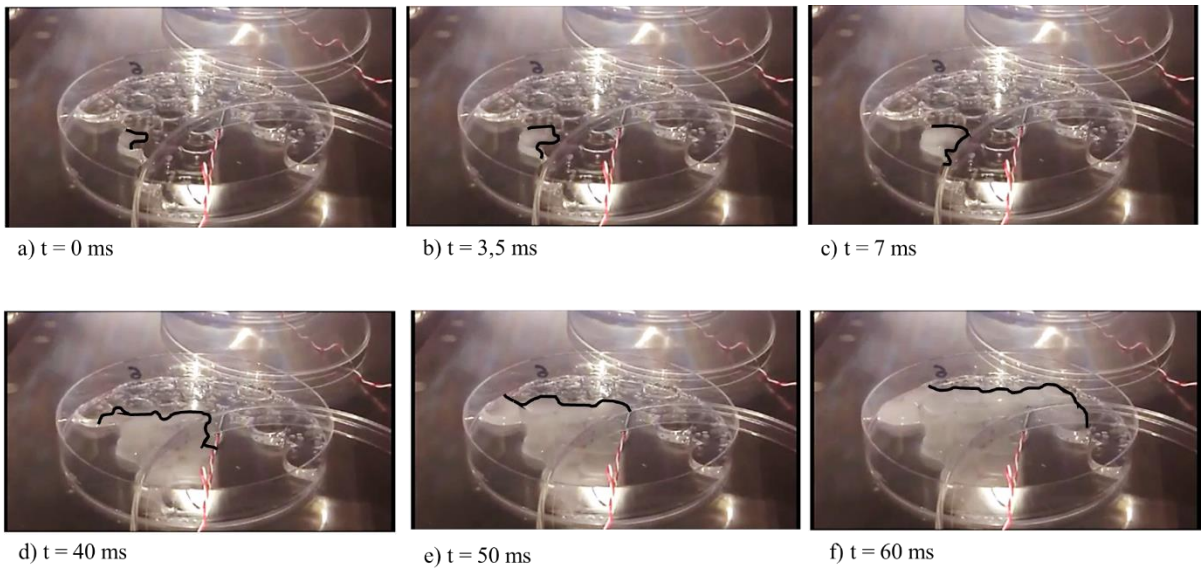


Figure 7 : Germination d'un hydrogel (a, b, c) et déplacement du front de solidification (tracé en noir) aux hydrogels adjacents (d, e, f) à la vitesse de 6 ± 0.5 $cm.s^{-1}$ pour un degré de surfusion de 11.2 °C. Les hydrogels sont des PUDNA 3% en équilibre avec de l'eau pure.

J'ai pu déterminer la vitesse de propagation du front, u ($cm.s^{-1}$) en enregistrant sous format vidéo la solidification (Smartphone, SM-J5), à l'aide du nombre d'images par seconde (f = 30 s^{-1}) et de la distance estimée en nombre de diamètre d'hydrogel (d = 12 ± 1 mm). Les vitesses de front obtenues dépendent du solvant d'équilibre et du degré de surfusion (**Tableau 6**). L'augmentation des vitesses de front avec l'augmentation du degré de surfusion respecte la tendance observée par (Hallett, 1964) qui propose la corrélation suivante $u = a\,(\Delta T)^n$ avec a et n des constantes qui dépendent des conditions expérimentales, n > 1. L'ordre de grandeur des vitesses de front est le même que celui observé par (Alekseenko et al., 2016) sur des gouttes d'eau (350 µL) de volume similaire aux hydrogels (140 ± 20 mm^3).

Solvant d'équilibre	Degrés de surfusion (ΔT)	Vitesse de front
Eau pure	11,2 °C	6 ± 0,5 cm.s^{-1}
	9,3 °C	3 ± 0,5 cm.s^{-1}
NaCl 0,25 g/L	9,3 °C	5 ± 0,5 cm.s^{-1}

Tableau 6 : Les vitesses de front de solidification dépendent du solvant et du degrés de surfusion pour des hydrogels PUDNA 3%.

6.2 Observation microscopique de la cinétique de solidification

Afin d'observer à l'échelle microscopique la solidification d'un hydrogel en surfusion, j'ai eu accès au microscope du LGMPA (Inra, AgroParistech) permettant de suivre un échantillon en cours de lyophilisation (**Figure 8**, (Fonseca et al., 2008)).

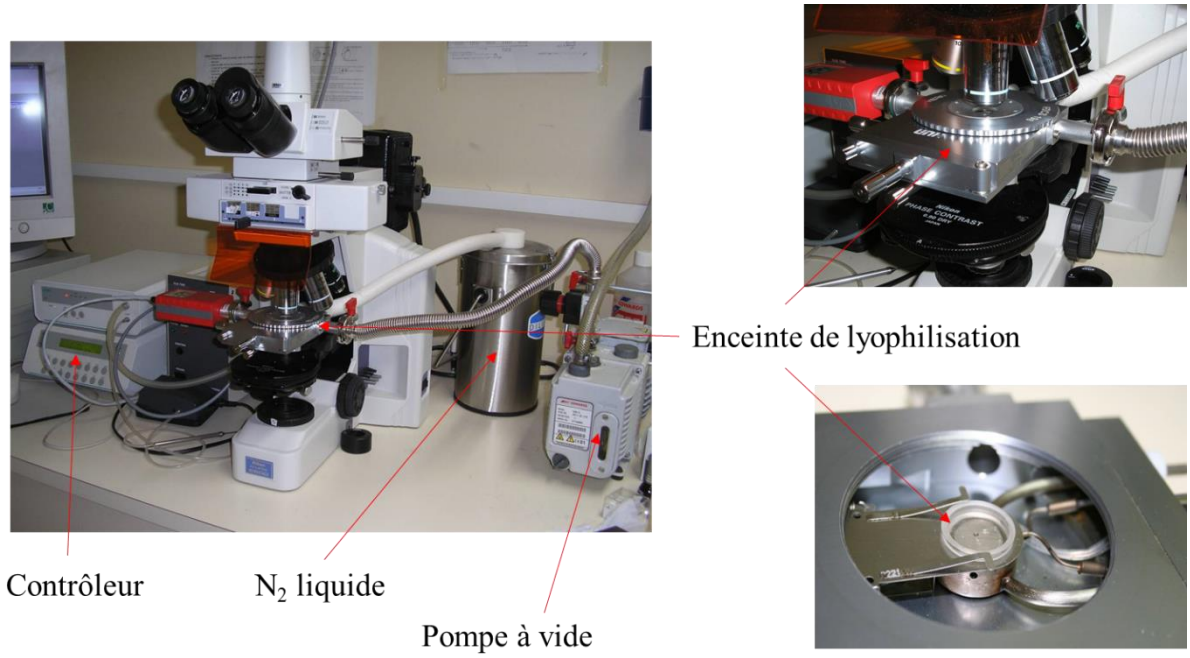


Figure 8 : Montage expérimental pour observation microscopique d'un hydrogel en cours de lyophilisation au LGPMA, Inra, AgroParisTech (Fonseca et al., 2008). Un microscope est monté sur une enceinte de lyophilisation (FDCS 196, Linkam) qui est refroidie par azote liquide (LNP94/2, Linkam) sous contrôle de température (TMS94, Linkam). Le vide est obtenu grâce à une pompe (Edwards E2M1.5).

L'enregistrement numérique des images s'effectue à l'aide d'une caméra Nikon Elipse E600 que j'ai remplacé par une caméra rapide (CMOS PCO 1200HS). Une fréquence

d'échantillonnage de 500 Hz permet de capturer le phénomène transitoire de changement de phase qui s'exprime par un changement d'opacité et de variation de hauteur du plan focal de l'objectif (**Figure 9**).

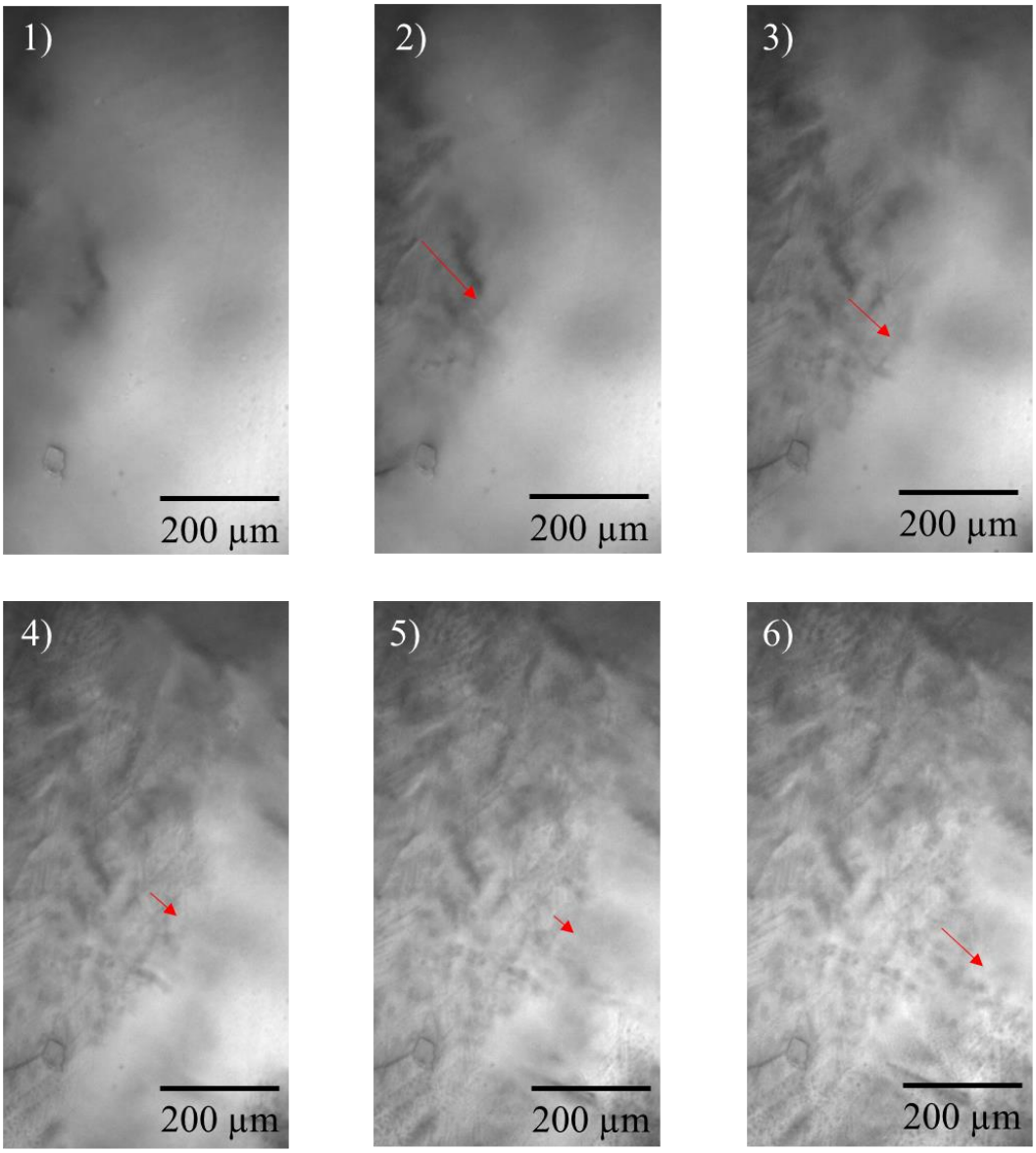


Figure 9 : Déplacement du front de solidification suivi en microscopie à lumière blanche avec acquisition à haute fréquence d'échantillonnage (500 Hz). L'hydrogel en équilibre avec NaCl 0.250 g.L-1 est refroidi à – 1°C.min^{-1} est subit une recalescence de 12,6 °C.

Cette transition se produit sur 6 images (12 ms) et sur une distance de l'ordre de 200 µm soit une vitesse de déplacement d'environ 10 cm.s^{-1} dont l'ordre de grandeur correspond aux observations précédentes (**Tableau 6**). A noter qu'un second phénomène transitoire a pu être observé sur une échelle de temps plus longue - environ 10 secondes - qui se manifeste par la croissance des cristaux de glaces. Les changements de hauteur de plan focaux ne nous ont pas permis de pouvoir photographier le phénomène.

6.3 Observation au microscope en lumière blanche de l'hydrogel solidifié

Trois matrices d'hydrogel ont été congelées avec une pente de refroidissement de 1°C.min-1, et ont subi un degré de surfusion de 12,6°C et 11,6°C. Les photographies en lumière blanche réalisé avec la caméra Nikon Elipse E600 sont présentées dans la **Figure 10**. Les grains de laces et les joints de matière sont clairement visibles. Il semblerait que la matrice avec le degré de surfusion le moins élevé présente des grains plus larges que les matrices avec des degrés de surfusion plus élevés.

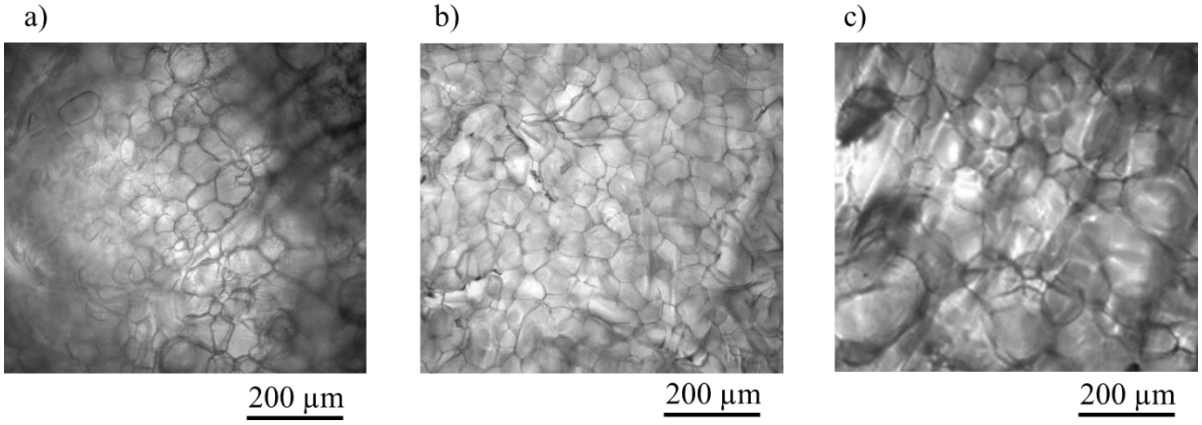


Figure 10 : Observation microscopique en lumière blanche d'un hydrogel solidifié après germination à -12.6°C (a, b) et -11.6 °C (c) lors d'un refroidissement à - 1°C.min^{-1}.

Remerciements

Je remercie chaleureusement Stéphanie Passot, Maître de Conférence, pour nous avoir accueilli au LGPMA et nous avoir aidé pour la prise en main du montage expérimental. Je remercie également Joel Casalinho du LGPM pour son aide et son expertise sur l'utilisation de la caméra rapide.

Chapitre IV

Résultats – 2ème Partie

Contrôle de la taille des pores dans une matrice d'hydrogel : effets du réticulant et de la température de germination lors de la lyophilisation

Préambule

Les résultats du chapitre III décrivent les mécanismes de la formation des pores dans la matrice d'hydrogel lors de la lyophilisation par le procédé de « ice-templating ». Le chapitre I rappelle que le contrôle de la taille des pores est primordial pour les besoins de l'ingénierie tissulaire osseuse Ce étudie les effets de deux paramètres lors de l'élaboration des matrices poreuses sur la porosité finale. Le rôle du réticulant corrélé à densité de ponts du réseau de polymère est étudié grâce à l'appui de la cryo-microscopie électronique et de la tomographie à rayon X. En parallèle, le biais induit par la température de germination est analysé puis contrôlé. Au final, ces deux paramètres peuvent être utilisés en concordance pour définir la taille des pores après lyophilisation. De plus, l'évolution de la structure poreuse lors de l'ensemencement de cellules est également étudiée grâce à une méthode originale qui repose sur l'utilisation de microsphères synthétiques.

Ces travaux sont l'objet d'un article en préparation pour publication sous la référence suivante :

Grenier, J., Duval, H., Lv, P., Barou, F., Le Guilcher, C., Aïd-Launais, R., David, B., & Letourneur, D. - Control of Pore Size in Hydrogel Scaffolds: Effects of Crosslinking and Nucleation during Freeze-Drying.

Ce chapitre reprend le contenu de l'article en anglais. Les suppléments sont placés en annexes.

Control of Pore Size in Hydrogel Scaffolds: Effects of Crosslinking and Nucleation during Freeze-Drying.

Jérôme Grenier, Hervé Duval*, Pin Lv, Fabrice Barou, Camille Le Guilcher, Rachida Aïd-Launais, Bertrand David[1], Didier Letourneur[1]

J. Grenier, H. Duval
Laboratoire LGPM, CentraleSupélec, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, 91190, France

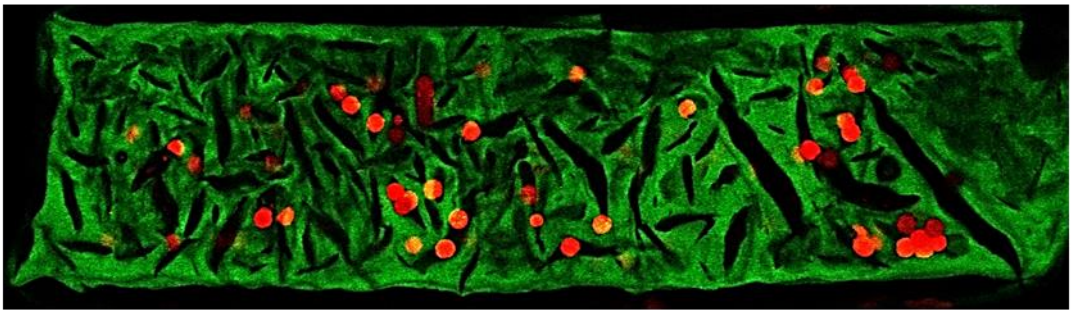
J. Grenier, B. David
Laboratoire MSSMat, UMR 8579 - CentraleSupélec, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, 91190, France

J. Grenier, C. Le Guilcher, R. Aïd-Launais, D. Letourneur
Université de Paris, Université Paris 13, INSERM 1148, LVTS, Hôpital Bichat, F-75018 Paris, France

P. Lv
LGPM, CentraleSupélec, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université Paris-Saclay, Centre Européen de Biotechnologie et de Bioéconomie (CEBB), F-51110 Pomacle, France

F. Barou
Géosciences Montpellier, UMR 5243, Université Montpellier, CNRS, Montpellier Cedex 05, 34095, France

* Corresponding author: herve.duval@centralesupelec.fr
[1] equal last authors



Keywords

Polysaccharide-based hydrogel; Ice-templating; Freeze-drying; Porous scaffolds; Cell seeding

The rest of this chapter is subject to a temporary embargo for online publication rights related to the publication of the results in a peer reviewed scientific journal. Please contact the author of this thesis to request a copy for personal use only.

Chapitre 5

Résultats – 3ème Partie

–

Organoïdes de MC3T3E1 cultivés dans des hydrogels poreux de polysaccharides : études expérimentales et numériques dans un bioréacteur

Préambule

Dans le Chapitre I, nous avons décrit l'intérêt des bioréacteurs à perfusion en ingénierie tissulaire osseuse. L'utilisation première des bioréacteurs à perfusion est la production de produits de thérapies cellulaire à partir de cellules souches et de matériaux poreux naturels ou synthétiques, ostéoconducteurs et résorbables pour former *in vitro* un biomatériau hybride en vue de son implantation *in vivo*. Une deuxième utilisation des bioréacteurs à perfusion vise à concevoir un modèle d'étude *in vitro* mimant les conditions physiologiques d'une réparation osseuse *in vivo*. Pour ce faire, il est nécessaire d'offrir aux cellules un environnement 3D contrôlé en apport de nutriment.
Ce chapitre étudie le comportement d'ostéoblastes M3CT3E1 ensemencés dans les matrices poreuses d'hydrogel et cultivés en 3D dans des conditions dynamiques en bioréacteur à perfusion. L'originalité de cette étude repose sur une approche qui combine d'une part, la modélisation de l'écoulement et du transport d'oxygène dans les matrices perfusées, et d'autre part, des mesures biologiques du devenir des cellules dans le bioréacteur.

Ces travaux font l'objet d'un article en préparation sous la référence suivante :

Grenier, J., Duval, H., Journé, C., Cicha, I., David, B., & Letourneur, D.
Culture of MC3T3E1 organoids within polysaccharide-based hydrogel scaffolds: experimental and numerical study at the bioreactor scale.

Ce chapitre reprend le contenu de l'article en français.

The rest of this chapter is subject to a temporary embargo for online publication rights related to the publication of the results in a peer reviewed scientific journal. Please contact the author of this thesis to request a copy for personal use only.

Conclusion Générale

Le traitement thérapeutique des défauts osseux de taille critique nécessite le développement de biomatériaux pour le comblement du site osseux lorsque l'autogreffe ne suffit pas. Il existe de nombreux biomatériaux de synthèse candidats pour l'ingénierie tissulaire osseuse. L'optimisation de ces biomatériaux passent par des études *in vitro* pertinentes qui tentent de mimer les conditions physiologiques d'un défaut osseux en reconstruction. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier un hydrogel de polysaccharides préalablement développé pour la reconstruction osseuse et qui a fait ses preuves *in vivo* chez l'animal.

Cette conclusion reprend les résultats majeurs de cette thèse et propose des directions de recherches futures pour répondre aux enjeux suscités.

L'hydrogel est obtenu après réticulation chimique de pullulane et de dextrane. Nous avons étudié cette réaction par rhéologie pour différentes quantités de réticulant. Nous avons mesuré une réticulation rapide (gélification en moins de 2 minutes) qui conduit à la formation d'un hydrogel essentiellement élastique. Le module d'élasticité de l'hydrogel varie de 3 kPa à 14 kPa. Grâce à la théorie des chaînes élastique nous avons calculé le nombre de liaisons par chaîne de polysaccharides. La densité des liaisons augmente avec la quantité de réticulant, ce qui permet de contrôler le paramètre de maille du réseau de polysaccharides. Les mailles du réseau sont de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres.

L'hydrogel est structuré grâce à un procédé de mise en forme par « ice-templating » qui survient lors de la lyophilisation. Nous avons pour la première fois décrit les mécanismes de formation des pores dans ce réseau de polysaccharides réticulé en nous appuyant sur des techniques de microscopie de pointe. La cryo-microscopie électronique nous a permis d'analyser les hydrogels congelés. La tomographie à rayon X nous a permis d'analyser en 3D l'ensemble de la porosité des hydrogels lyophilisés. Nous avons montré le lien entre la structure poreuse lyophilisée et la structure solide obtenue lors de la congélation.

La congélation de l'hydrogel est précédée par la germination de la glace. Nous avons étudié l'influence du paramètre de maille du réseau de polysaccharides sur la germination. Nous avons prouvé que le réseau de polysaccharides était responsable de la destruction des aiguilles de glace ce qui aboutit à une germination secondaire de la glace. La structure solide obtenue présente alors des cristaux de glace désorientés et de l'ordre de la centaine de micromètres. Leur taille moyenne diminue lorsque le réseau de polysaccharide est fortement réticulé. En conséquence, la taille moyenne des pores de l'hydrogel lyophilisé diminue lorsque la taille du réseau de polysaccharide diminue. Nous avons donc prouvé que la quantité de réticulant permet de contrôler la taille de pores.

Nous avons ensuite mesuré la température à laquelle la germination de la glace a lieu. Cette température est par nature distribuée aléatoirement autour d'une valeur moyenne de - 13°C.

Nous avons prouvé que la température de germination de la glace dans l'hydrogel détermine la taille des pores lyophilisés : plus la température est basse, plus les pores sont petits. De sorte à réduire la variabilité intrinsèque de la porosité des hydrogels lyophilisés, il serait donc intéressant de mettre au point des dispositifs industrialisables de contrôle de ce paramètre de germination.

Les hydrogels poreux sont ensuite étudiés *in vitro* en présence de cellules d'ostéoblastes de souris. Au contact du milieu de culture, les hydrogels lyophilisés gonflent et la taille des pores diminue ainsi que la porosité. Nous avons pu établir une relation entre la taille des pores hydratés et la taille des pores lyophilisés grâce à la microscopie confocale et à des mesures de taux de gonflement. La porosité de l'hydrogel lyophilisée chute de 93% à 29% lors du gonflement et la taille moyenne des pores diminue de 280 µm dans l'état lyophilisé à 54 µm dans l'état hydraté.

Nous avons constaté les limitations de l'analyse microscopique confocale liées à la diffusion du laser dans l'eau qui constitue 90% de l'hydrogel. L'analyse 3D est alors limitée à un quart de l'épaisseur totale de l'hydrogel. Il serait pertinent de réaliser l'acquisition 3D de la microporosité sur l'ensemble de l'épaisseur hydratée à l'aide d'autres technologies comme l'IRM.

Nous avons montré qu'il était possible d'ensemencer des billes de taille supérieure à la taille des pores hydratés en pratiquant l'ensemencement sur la structure poreuse lyophilisée. Cette méthode permettrait d'ensemencer des cellules sous forme d'amas ayant une taille supérieure à 54 µm. Ce résultat est très prometteur pour la culture de cellules en 3D sous forme d'organoïdes au sein d'un hydrogel poreux.

Les hydrogels poreux ensemencés de cellules individualisées d'ostéoblastes sont colonisés de façon homogène. Les cellules forment spontanément des amas d'environ 50 µm à l'intérieur des pores de l'hydrogel. Nous avons montré que la taille moyenne de ces amas augmente lorsque le nombre de cellules ensemencées est plus important.

Ces amas de cellules ont été cultivées au sein des hydrogels poreux dans un bioréacteur à perfusion pour mimer *in vitro* des conditions physiologiques. Nous avons montré expérimentalement que l'écoulement du milieu nutritif dans le bioréacteur à perfusion permettait de maintenir la viabilité des cellules. Nous avons simulé numériquement par une méthode de Boltzmann sur réseau l'écoulement dans le bioréacteur et nous avons confirmé que le transport en oxygène dans le bioréacteur était suffisant pour maintenir la viabilité des cellules.

Le transport et la consommation de l'oxygène par les cellules dans les hydrogels poreux a été simulé pour différentes organisations de cellules. Nous avons ainsi montré que la taille des amas de cellules et leur nombre doivent être contrôlés pour éviter que des cellules soient privées d'oxygène au sein de l'hydrogel.

Pour nourrir le code de calcul, le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'hydrogel a été mesuré expérimentalement dans un dispositif dédié. Les paramètres biologiques de la loi de consommation de l'oxygène par les ostéoblastes ont été estimé à partir de la bibliographie. Il serait intéressant de mesurer directement la vitesse de consommation de l'oxygène par les cellules que nous utilisons. La transposition à d'autres espèces chimiques comme le glucose serait très intéressante pour décrire plus précisément l'environnement des cellules.

Les expérimentations en bioréacteur à perfusion ont été conduites sur 19 jours avec préservation de la viabilité des cellules, ce qui constitue une première étape préalable à des investigations plus approfondies. Il serait ensuite opportun de poursuivre les expériences afin d'étudier *in vitro* les mécanismes de différentiation des ostéoblastes et la production d'une matrice extracellulaire minéralisée.

Pour produire des conditions favorables à la différentiation, une première méthode consisterait à ajouter dans le milieu nutritif des produits reconnus pour leur capacité à initier la différentiation des cellules (acide ascorbique, dexamethasone et béta-glycérophosphate). L'ajout de cristaux d'hydroxyapatite, le composé minéral du tissu osseux, connus pour son rôle dans l'adhésion et la différentiation des ostéoblastes pourrait permettre de mimer un état physiologique intermédiaire de construction d'un cal osseux dur. Une autre méthode consisterait à définir une porosité des hydrogels et un débit de perfusion capable de solliciter les cellules par des cisaillements favorables. De plus, la caractérisation de l'environnement mécanique des cellules au sein des matrices pourrait être améliorée en établissant un modèle de mécanique des milieux continus pour calculer la contrainte exercée par l'hydrogel sur les cellules, du fait de la pression hydrostatique du fluide.

Ces deux dernières approches soulèvent deux enjeux expérimentaux : (i) améliorer la résolution de l'acquisition de la porosité des matrices dans l'empilement du bioréacteur, par exemple par IRM, (ii) caractériser plus finement les propriétés élastiques locales de l'hydrogel, par exemple par nano-indentation. De plus, un compromis devra être trouvé pour les méthodes de simulations numériques entre la résolution et la taille du domaine étudié.

Pour conclure, nous avons mis en place une stratégie de caractérisation des propriétés d'un biomatériau pour l'ingénierie tissulaire osseuse dans un dispositif d'étude *in vitro* en conditions dynamiques de culture. Cette stratégie pourrait être adapté à d'autres biomatériaux en visant la médecine régénératrice pour d'autres tissus.

Bibliographie

Agrawal, S.G., Paterson, A.H.J., 2015. Secondary Nucleation: Mechanisms and Models. Chem. Eng. Commun. 202, 698–706. https://doi.org/10.1080/00986445.2014.969369

Aichelmann-Reidy, M.E., Yukna, R.A., 1998. Bone replacement grafts. The bone substitutes. Dent. Clin. North Am. 42, 491–503.

Al-Abboodi, A., Fu, J., Doran, P.M., Tan, T.T.Y., Chan, P.P.Y., 2014. Injectable 3D Hydrogel Scaffold with Tailorable Porosity Post-Implantation. Adv. Healthc. Mater. 3, 725–736. https://doi.org/10.1002/adhm.201300303

Albrektsson, T., Johansson, C., 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J 6.

Alekseenko, S.V., Mendig, C., Schulz, M., Sinapius, M., Prykhodko, O.A., 2016. An experimental study of freezing of supercooled water droplet on solid surface. Tech. Phys. Lett. 42, 524–527. https://doi.org/10.1134/S1063785016050187

Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Domann, E., Schnettler, R., 2004. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials 25, 4383–4391. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.078

Anseth, K.S., Bowman, C.N., Brannon-Peppas, L., 1996. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. Biomaterials 17, 1647–1657. https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87644-7

Ashworth, J.C., Mehr, M., Buxton, P.G., Best, S.M., Cameron, R.E., 2015. Cell Invasion in Collagen Scaffold Architectures Characterized by Percolation Theory. Adv. Healthc. Mater. 4, 1317–1321. https://doi.org/10.1002/adhm.201500197

ASTM F2450-18, 2018. Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue-Engineered Medical Products. ASTM International. https://doi.org/10.1520/F2450-18

Autissier, A., Letourneur, D., Le Visage, C., 2007. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. J. Biomed. Mater. Res. A 82A, 336–342. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30998

Autissier, A., Visage, C.L., Pouzet, C., Chaubet, F., Letourneur, D., 2010. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. Acta Biomater. 6, 3640–3648. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.004

Bacabac, R.G., Smit, T.H., Cowin, S.C., Van Loon, J.J.W.A., Nieuwstadt, F.T.M., Heethaar, R., Klein-Nulend, J., 2005. Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers. J. Biomech. 38, 159–167. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.03.020

Bae, H., Ahari, A.F., Shin, H., Nichol, J.W., Hutson, C.B., Masaeli, M., Kim, S.-H., Aubin, H., Yamanlar, S., Khademhosseini, A., 2011. Cell-laden microengineered pullulan methacrylate hydrogels promote cell proliferation and 3D cluster formation. Soft Matter 7, 1903. https://doi.org/10.1039/c0sm00697a

Bancroft, G.N., Sikavitsas, V.I., Van Den Dolder, J., Sheffield, T.L., Ambrose, C.G., Jansen, J.A., Mikos, A.G., 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 12600–12605.

Baraniak, P.R., McDevitt, T.C., 2012. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. Cell Tissue Res. 347, 701–711. https://doi.org/10.1007/s00441-011-1215-5

Bell, C.C., Hendriks, D.F.G., Moro, S.M.L., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Fredriksson Puigvert, L., Dankers, A.C.A., Jacobs, F., Snoeys, J., Sison-Young, R.L., Jenkins, R.E., Nordling, Å., Mkrtchian, S., Park, B.K., Kitteringham, N.R., Goldring, C.E.P., Lauschke, V.M., Ingelman-Sundberg, M., 2016. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. Sci. Rep. 6. https://doi.org/10.1038/srep25187

Bencherif, S.A., Warren Sands, R., Ali, O.A., Li, W.A., Lewin, S.A., Braschler, T.M., Shih, T.-Y., Verbeke, C.S., Bhatta, D., Dranoff, G., Mooney, D.J., 2015. Injectable cryogel-based whole-cell cancer vaccines. Nat. Commun. 6, 7556. https://doi.org/10.1038/ncomms8556

Bernhardt, A., Koperski, K., Schumacher, M., Gelinsky, M., 2017. Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays. Eur. Cell. Mater. 33, 28–42. https://doi.org/10.22203/eCM.v033a03

Beuvelot, J., Portet, D., Lecollinet, G., Moreau, M.-F., Baslé, M.F., Chappard, D., Libouban, H., 2009. *In vitro* kinetic study of growth and mineralization of osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surface coated with a RGD functionalized bisphosphonate. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 90B, 873–881. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31357

Bonnard, T., 2014. Mise au point de microparticules polysaccharidesinjectables pour l'imagerie moléculaire de pathologies artérielles (Imagerie médicale). Université Paris-Nord - Paris XIII.

Bose, S., Vahabzadeh, S., Bandyopadhyay, A., 2013. Bone tissue engineering using 3D printing. Mater. Today 16, 496–504. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.11.017

Brougham, C.M., Levingstone, T.J., Shen, N., Cooney, G.M., Jockenhoevel, S., Flanagan, T.C., O'Brien, F.J., 2017. Freeze-Drying as a Novel Biofabrication Method for Achieving a Controlled Microarchitecture within Large, Complex Natural Biomaterial Scaffolds. Adv. Healthc. Mater. 6, 1700598. https://doi.org/10.1002/adhm.201700598

Buliga, G.S., Brant, D.A., 1987. Temperature and molecular weight dependence of the unperturbed dimensions of aqueous pullulan. Int. J. Biol. Macromol. 9, 71–76. https://doi.org/10.1016/0141-8130(87)90029-8

Calori, G.M., Mazza, E., Colombo, M., Ripamonti, C., 2011. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? Injury 42, S56–S63. https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.011

Campbell, J.J., Husmann, A., Hume, R.D., Watson, C.J., Cameron, R.E., 2017. Development of three-dimensional collagen scaffolds with controlled architecture for cell migration studies using breast cancer cell lines. Biomaterials 114, 34–43. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.048

Canal, T., Peppas, N.A., 1989. Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks. J. Biomed. Mater. Res. 23, 1183–1193. https://doi.org/10.1002/jbm.820231007

Capone, S.H., Dufresne, M., Rechel, M., Fleury, M.-J., Salsac, A.-V., Paullier, P., Daujat-Chavanieu, M., Legallais, C., 2013. Impact of Alginate Composition: From Bead Mechanical Properties to Encapsulated HepG2/C3A Cell Activities for In Vivo Implantation. PLoS ONE 8, e62032. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062032

Carano, R.A.D., Filvaroff, E.H., 2003. Angiogenesis and bone repair. Drug Discov. Today 8, 980–989. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02866-6

Carman, P.C., 1939. Permeability of saturated sands, soils and clays. J. Agric. Sci. 29, 262–273. https://doi.org/10.1017/S0021859600051789

Carman, P.C., Haul, R.A., 1954. Measurement of diffusion coefficients. Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci. 222, 109–118. https://doi.org/10.1098/rspa.1954.0056

Cartmell, S.H., Porter, B.D., García, A.J., Guldberg, R.E., 2003. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro. Tissue Eng. 9, 1197–1203.

Cassanelli, M., Norton, I., Mills, T., 2018. Role of gellan gum microstructure in freeze drying and rehydration mechanisms. Food Hydrocoll. 75, 51–61. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.013

Catherine Le Visage, Didier Letourneur, Frederic Chaubet, Aude Autissier, 2015. Method for preparing porous scaffold for tissue engineering. US9028857B2.

Chabanon, M., 2015. Multiscale study of a perfusion bioreactor for bone tissue engineering. Ecole Centrale Paris, Châtenay-Malabry.

Chabanon, M., Duval, H., Francais, O., Lepioufle, B., Perrin, E., Goyeau, B., David, B., 2012. Discrete model combined with mimetic microfluidic chips to study cell growth in porous scaffold under flow conditions. Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin. 15, 25–26. https://doi.org/10.1080/10255842.2012.713699

Chabanon, M., Duval, H., Grenier, J., Beauchesne, C., Goyeau, B., David, B., 2019. Histological Method to Study the Effect of Shear Stress on Cell Proliferation and Tissue Morphology in a Bioreactor. Tissue Eng. Regen. Med. 16, 225–235. https://doi.org/10.1007/s13770-019-00181-3

Chambon, F., Winter, H.H., 1987. Linear Viscoelasticity at the Gel Point of a Crosslinking PDMS with Imbalanced Stoichiometry. J. Rheol. 31, 683–697. https://doi.org/10.1122/1.549955

Chaouat, M., Le Visage, C., Autissier, A., Chaubet, F., Letourneur, D., 2006. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. Biomaterials 27, 5546–5553. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.032

Chauve, T., Montagnat, M., Barou, F., Hidas, K., Tommasi, A., Mainprice, D., 2017. Investigation of nucleation processes during dynamic recrystallization of ice using cryo-EBSD. Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci. 375, 20150345. https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0345

Cho, C.H., Park, J., Nagrath, D., Tilles, A.W., Berthiaume, F., Toner, M., Yarmush, M.L., 2007. Oxygen uptake rates and liver-specific functions of hepatocyte and 3T3 fibroblast co-cultures. Biotechnol. Bioeng. 97, 188–199. https://doi.org/10.1002/bit.21225

Chow, R., Blindt, R., Chivers, R., Povey, M., 2003. The sonocrystallisation of ice in sucrose solutions: primary and secondary nucleation. Ultrasonics 41, 595–604. https://doi.org/10.1016/j.ultras.2003.08.001

Chung, C.A., Chen, C.W., Chen, C.P., Tseng, C.S., 2007. Enhancement of cell growth in tissue-engineering constructs under direct perfusion: Modeling and simulation. Biotechnol. Bioeng. 97, 1603–1616. https://doi.org/10.1002/bit.21378

Clarke, B., 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 3, S131. https://doi.org/10.2215/CJN.04151206

Cooper, A.I., 2000. Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide. J. Mater. Chem. 10, 207–234. https://doi.org/10.1039/a906486i

Coward, S.M., Legallais, C., David, B., Thomas, M., Foo, Y., Mavri-Damelin, D., Hodgson, H.J., Selden, C., 2009. Alginate-encapsulated HepG2 Cells in a Fluidized Bed Bioreactor Maintain Function in Human Liver Failure Plasma: Artif. Organs 33, 1117–1126. https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00821.x

Cruel, M., Bensidhoum, M., Nouguier-Lehon, C., Dessombz, O., Becquart, P., Petite, H., Hoc, T., 2015. Numerical study of granular scaffold efficiency to convert fluid flow into mechanical stimulation in bone tissue engineering. Tissue Eng. Part C Methods 21, 863–871.

Czekanska, E.M., 2014. In vitro cell and culture models for osteoblasts and their progenitors (Thesis). Cardiff University.

Czekanska, E.M., Stoddart, M.J., Ralphs, J.R., Richards, R.G., Hayes, J.S., 2014. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing: Phenotypic Comparison of Osteoblast Cell Lines. J. Biomed. Mater. Res. A 102, 2636–2643. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34937

d'Humières, D., 2002. Multiple–relaxation–time lattice Boltzmann models in three dimensions. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Eng. Sci. 360, 437–451. https://doi.org/10.1098/rsta.2001.0955

Dagalakis, N., Flink, J., Stasikelis, P., Burke, J.F., Yannas, I.V., 1980. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. J. Biomed. Mater. Res. 14, 511–528.

David, B., Bonnefont-Rousselot, D., Oudina, K., Degat, M.-C., Deschepper, M., Viateau, V., Bensidhoum, M., Oddou, C., Petite, H., 2011. A Perfusion Bioreactor for Engineering Bone Constructs: An *In Vitro* and *In Vivo* Study. Tissue Eng. Part C Methods 17, 505–516. https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0468

de Taxis du Poët, P., Arcand, Y., Bernier, R., Barbotin, J.N., Thomas, D., 1987. Plasmid stability in immobilized and free recombinant Escherichia coli JM105(pKK223-200): importance of oxygen diffusion, growth rate, and plasmid copy number. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1548.

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

Deville, S., 2006. Freezing as a Path to Build Complex Composites. Science 311, 515–518. https://doi.org/10.1126/science.1120937

Deville, S., Maire, E., Lasalle, A., Bogner, A., Gauthier, C., Leloup, J., Guizard, C., 2009. In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particle Suspensions-Part I: Initial Instants. J. Am. Ceram. Soc. 92, 2489–2496. https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2009.03163.x

Drury, J.L., Mooney, D.J., 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. Biomaterials 24, 4337–4351. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5

Ehret, C., Aid-Launais, R., Sagardoy, T., Siadous, R., Bareille, R., Rey, S., Pechev, S., Etienne, L., Kalisky, J., de Mones, E., Letourneur, D., Amedee Vilamitjana, J., 2017. Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation. PLOS ONE 12, e0184663. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184663

F04 Committee, 2010. Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue-Engineered Medical Products. ASTM International. https://doi.org/10.1520/F2450-10

Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., de Boer, J., 2013. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. Trends Biotechnol. 31, 108–115. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003

Fernández-Nieves, A., Fernández-Barbero, A., de las Nieves, F.J., 2001. Salt effects over the swelling of ionized mesoscopic gels. J. Chem. Phys. 115, 7644–7649. https://doi.org/10.1063/1.1403002

Fonseca, F., Passot, S., Cunin, O., Marin, M., 2008. Collapse Temperature of Freeze-Dried Lactobacillus bulgaricusSuspensions and Protective Media. Biotechnol. Prog. 20, 229–238. https://doi.org/10.1021/bp034136n

Frangos, J.A., McIntire, L.V., Eskin, S.G., 1988. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. Biotechnol. Bioeng. 32, 1053–1060.

Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., 2001. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. Prog. Mater. Sci. 46, 273–282. https://doi.org/10.1016/S0079-6425(00)00018-9

Fricain, J.C., Aid, R., Lanouar, S., Maurel, D.B., Le Nihouannen, D., Delmond, S., Letourneur, D., Amedee Vilamitjana, J., Catros, S., 2018. In-vitro and in-vivo design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. Dent. Mater. 34, 1024–1035. https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021

Fricain, J.C., Schlaubitz, S., Le Visage, C., Arnault, I., Derkaoui, S.M., Siadous, R., Catros, S., Lalande, C., Bareille, R., Renard, M., Fabre, T., Cornet, S., Durand, M., Léonard, A., Sahraoui, N., Letourneur, D., Amédée, J., 2013. A nano-hydroxyapatite – Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. Biomaterials 34, 2947–2959. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.049

Gennes, P.G. de, 1979. Scaling concepts in polymer physics. Cornell University Press, Ithaca, N.Y.

Ginzburg, I., 2017. Prediction of the moments in advection-diffusion lattice Boltzmann method. I. Truncation dispersion, skewness, and kurtosis. Phys. Rev. E 95, 013304. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.95.013304

Ginzburg, I., d'Humières, D., 2003. Multireflection boundary conditions for lattice Boltzmann models. Phys. Rev. E 68, 066614. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.68.066614

Ginzburg, I., d'Humières, D., Kuzmin, A., 2010. Optimal Stability of Advection-Diffusion Lattice Boltzmann Models with Two Relaxation Times for Positive/Negative Equilibrium. J. Stat. Phys. 139, 1090–1143. https://doi.org/10.1007/s10955-010-9969-9

Goldstein, A., 2001. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. Biomaterials 22, 1279–1288. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00280-5

Gombotz, W.R., Guanghui, W., Horbett, T.A., Hoffman, A.S., 1991. Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. J. Biomed. Mater. Res. 25, 1547–1562. https://doi.org/10.1002/jbm.820251211

Grenier, J., Duval, H., Barou, F., Lv, P., David, B., Letourneur, D., 2019. Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying. Acta Biomater. 94, 195–203. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.070

Griffith, L.G., Swartz, M.A., 2006. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 211–224. https://doi.org/10.1038/nrm1858

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 15655–15660. https://doi.org/10.1073/pnas.232137699

Guerrero, J., Catros, S., Derkaoui, S.-M., Lalande, C., Siadous, R., Bareille, R., Thébaud, N., Bordenave, L., Chassande, O., Le Visage, C., Letourneur, D., Amédée, J., 2013. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. Acta Biomater. 9, 8200–8213. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.025

Guerrero, J., Oliveira, H., Aid, R., Bareille, R., Siadous, R., Letourneur, D., Mao, Y., Kohn, J., Amédée, J., 2018. Influence of the three-dimensional culture of human bone marrow mesenchymal stromal cells within a macroporous polysaccharides scaffold on Pannexin

1 and Pannexin 3. J. Tissue Eng. Regen. Med. 12, e1936–e1949. https://doi.org/10.1002/term.2625

Gunness, P., Mueller, D., Shevchenko, V., Heinzle, E., Ingelman-Sundberg, M., Noor, F., 2013. 3D Organotypic Cultures of Human HepaRG Cells: A Tool for In Vitro Toxicity Studies. Toxicol. Sci. 133, 67–78. https://doi.org/10.1093/toxsci/kft021

Gupte, M.J., Swanson, W.B., Hu, J., Jin, X., Ma, H., Zhang, Z., Liu, Z., Feng, K., Feng, G., Xiao, G., Hatch, N., Mishina, Y., Ma, P.X., 2018. Pore size directs bone marrow stromal cell fate and tissue regeneration in nanofibrous macroporous scaffolds by mediating vascularization. Acta Biomater. 82, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.016

Hadjidakis, D.J., Androulakis, I.I., 2006. Bone Remodeling. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1092, 385–396. https://doi.org/10.1196/annals.1365.035

Hallett, J., 1964. Experimental Studies of the Crystallization of Supercooled Water. J. Atmospheric Sci. 21, 671–682. https://doi.org/10.1175/1520-0469(1964)021<0671:ESOTCO>2.0.CO;2

Happel, J., Brenner, H., 1981. Low Reynolds number hydrodynamics: with special applications to particulate media. Springer Netherlands, Dordrecht.

Heinemann, C., Heinemann, S., Worch, H., Hanke, T., 2011. Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. Eur. Cell. Mater. 21, 80–93. https://doi.org/10.22203/eCM.v021a07

Heslop, R.B., Ramsey, Ann.C., 1969. The solvent extraction of vanadomolybdophosphoric acid as the basis of a substoichiometric method for the determination of phosphorus. Anal. Chim. Acta 47, 305–314. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)95682-X

Hidalgo-Bastida, L.A., Cartmell, S.H., 2010. Mesenchymal Stem Cells, Osteoblasts and Extracellular Matrix Proteins: Enhancing Cell Adhesion and Differentiation for Bone Tissue Engineering. Tissue Eng. Part B Rev. 16, 405–412. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0714

Hobbs, P.V., 1974. Ice physics. Oxford, Clarendon Press.

Hossain, Md.S., Bergstrom, D.J., Chen, X.B., 2015a. Modelling and simulation of the chondrocyte cell growth, glucose consumption and lactate production within a porous tissue scaffold inside a perfusion bioreactor. Biotechnol. Rep. 5, 55–62. https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.002

Hossain, Md.S., Bergstrom, D.J., Chen, X.B., 2015b. Prediction of cell growth rate over scaffold strands inside a perfusion bioreactor. Biomech. Model. Mechanobiol. 14, 333–344. https://doi.org/10.1007/s10237-014-0606-4

Hulst, A.C., Hens, H.J.H., Buitelaar, R.M., Tramper, J., 1989. Determination of the effective diffusion coefficient of oxygen in gel materials in relation to gel concentration. Biotechnol. Tech. 3, 199–204.

İmren, D., Gümüşderelioğlu, M., Güner, A., 2006. Synthesis and characterization of dextran hydrogels prepared with chlor- and nitrogen-containing crosslinkers. J. Appl. Polym. Sci. 102, 4213–4221. https://doi.org/10.1002/app.24670

Ivanov, D.P., Parker, T.L., Walker, D.A., Alexander, C., Ashford, M.B., Gellert, P.R., Garnett, M.C., 2014. Multiplexing Spheroid Volume, Resazurin and Acid Phosphatase Viability Assays for High-Throughput Screening of Tumour Spheroids and Stem Cell Neurospheres. PLoS ONE 9, e103817. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103817

Jana, S., Cooper, A., Zhang, M., 2013. Chitosan Scaffolds with Unidirectional Microtubular Pores for Large Skeletal Myotube Generation. Adv. Healthc. Mater. 2, 557–561. https://doi.org/10.1002/adhm.201200177

Janssen, F.W., Hofland, I., van Oorschot, A., Oostra, J., Peters, H., van Blitterswijk, C.A., 2006. Online measurement of oxygen consumption by goat bone marrow stromal cells in a combined cell-seeding and proliferation perfusion bioreactor. J. Biomed. Mater. Res. A 79A, 338–348. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30794

Jungreuthmayer, C., Jaasma, M.J., Al-Munajjed, A.A., Zanghellini, J., Kelly, D.J., O'Brien, F.J., 2009. Deformation simulation of cells seeded on a collagen-GAG scaffold in a flow perfusion bioreactor using a sequential 3D CFD-elastostatics model. Med. Eng. Phys. 31, 420–427. https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2008.11.003

Kang, H.-W., Tabata, Y., Ikada, Y., 1999. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 20, 1339–1344. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00036-8

Kapur, S., Baylink, D.J., William Lau, K.-H., 2003. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. Bone 32, 241–251. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00979-1

Katiyar, A., Duncan, R.L., Sarkar, K., 2014. Ultrasound stimulation increases proliferation of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells. J. Ther. Ultrasound 2, 1. https://doi.org/10.1186/2050-5736-2-1

Kendall, K., 2007. Molecular adhesion and its applications: the sticky universe. Springer Science & Business Media.

Kitaori, T., Ito, H., Schwarz, E.M., Tsutsumi, R., Yoshitomi, H., Oishi, S., Nakano, M., Fujii, N., Nagasawa, T., Nakamura, T., 2009. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. Arthritis Rheum. 60, 813–823. https://doi.org/10.1002/art.24330

Klembt Andersen, L., Antoranz Contera, S., Justesen, J., Duch, M., Hansen, O., Chevallier, J., Foss, M., Pedersen, F., Besenbacher, F., 2005. Cell volume increase in murine MC3T3-E1 pre-osteoblasts attaching onto biocompatible Tantalum observed by magnetic AC mode Atomic Force Microscopy. Eur. Cell. Mater. 10, 61–69. https://doi.org/10.22203/eCM.v010a07

Komori, T., 2009. Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2, in: Choi, Y. (Ed.), Osteoimmunology. Springer US, Boston, MA, pp. 43–49. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1050-9_5

Kunz-Schughart, L.A., Doetsch, J., Mueller-Klieser, W., Groebe, K., 2000. Proliferative activity and tumorigenic conversion: impact on cellular metabolism in 3-D culture. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 278, C765–C780. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.4.C765

Lack, S., Dulong, V., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J.F., Muller, G., 2004. Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study. Polym. Bull. 52, 429–436. https://doi.org/10.1007/s00289-004-0299-4

Lack, S., Dulong, V., Picton, L., Cerf, D.L., Condamine, E., 2007. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. Carbohydr. Res. 342, 943–953. https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.01.011

Lakhotia, S., Papoutsakis, E.T., 1992. Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: Experiments and modeling. Biotechnol. Bioeng. 39, 95–107. https://doi.org/10.1002/bit.260390114

Lanouar, S., Aid-Launais, R., Oliveira, A., Bidault, L., Closs, B., Labour, M.-N., Letourneur, D., 2018. Effect of cross-linking on the physicochemical and in vitro properties of

pullulan/dextran microbeads. J. Mater. Sci. Mater. Med. 29, 77. https://doi.org/10.1007/s10856-018-6085-x
Laschke, M.W., Menger, M.D., 2017. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. Trends Biotechnol. 35, 133–144. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.004
Lavergne, M., Derkaoui, M., Delmau, C., Letourneur, D., Uzan, G., Le Visage, C., 2012. Porous Polysaccharide-Based Scaffolds for Human Endothelial Progenitor Cells. Macromol. Biosci. 12, 901–910. https://doi.org/10.1002/mabi.201100431
Leclerc, E., David, B., Griscom, L., Lepioufle, B., Fujii, T., Layrolle, P., Legallaisa, C., 2006. Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment. Biomaterials 27, 586–595. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.002
Lee, J., Cuddihy, M.J., Cater, G.M., Kotov, N.A., 2009. Engineering liver tissue spheroids with inverted colloidal crystal scaffolds. Biomaterials 30, 4687–4694. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.024
Li, J., Baker, Bryan.A., Mou, X., Ren, N., Qiu, J., Boughton, R.I., Liu, H., 2014. Biopolymer/Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Adv. Healthc. Mater. 3, 469–484. https://doi.org/10.1002/adhm.201300562
Li, W.-J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S., Ko, F.K., 2001. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. J. Biomed. Mater. Res. 9. https://doi.org/10.1002/jbm.10167
Li, X., Liu, H., Niu, X., Fan, Y., Feng, Q., Cui, F., Watari, F., 2011. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells induced by osteoinductive calcium phosphate ceramics. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 97B, 10–19. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31773
Liegibel, U., Sommer, U., Bundschuh, B., Schweizer, B., Hilscher, U., Lieder, A., Nawroth, P., Kasperk, C., 2004. Fluid Shear of Low Magnitude Increases Growth and Expression of TGFβ1 and Adhesion Molecules in Human Bone Cells *in Vitro*. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 112, 356–363. https://doi.org/10.1055/s-2004-821014
Lin, L., Chow, K.L., Leng, Y., 2009. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. J. Biomed. Mater. Res. A 89A, 326–335. https://doi.org/10.1002/jbm.a.31994
Liu, B., Han, S., Hedrick, B.P., Modarres-Sadeghi, Y., Lynch, M.E., 2018. Perfusion applied to a 3D model of bone metastasis results in uniformly dispersed mechanical stimuli. Biotechnol. Bioeng. 115, 1076–1085. https://doi.org/10.1002/bit.26524
Liu, X., Ma, P.X., 2004. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Ann. Biomed. Eng. 32, 477–786. https://doi.org/10.1023/B:ABME.0000017544.36001.8e
Loh, Q.L., Choong, C., 2013. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. Tissue Eng. Part B Rev. 19, 485–502. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437
Lu, Liu, X., Dai, L., Tong, Z., 2005. Difference in Concentration Dependence of Relaxation Critical Exponent *n* for Alginate Solutions at Sol−Gel Transition Induced by Calcium Cations. Biomacromolecules 6, 2150–2156. https://doi.org/10.1021/bm050126u
Ma, P.X., Langer, R., 1998. Fabrication of Biodegradable Polymer Foams for Cell Transplantation and Tissue Engineering, in: Tissue Engineering. Humana Press, New Jersey, pp. 47–56. https://doi.org/10.1385/0-89603-516-6:47
Manassero, M., Viateau, V., Deschepper, M., Oudina, K., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., Bensidhoum, M., 2013. Bone Regeneration in Sheep Using *Acropora* Coral, a Natural Resorbable Scaffold, and Autologous Mesenchymal Stem Cells. Tissue Eng. Part A 19, 1554–1563. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0008

McCoy, R.J., Jungreuthmayer, C., O'Brien, F.J., 2012. Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor. Biotechnol. Bioeng. 109, 1583–1594. https://doi.org/10.1002/bit.24424

McKibbin, B., 1978. The biology of fracture healing in long bones. J. Bone Joint Surg. Br. 60-B, 150–162.

Milford, D., Rosbach, N., Bendszus, M., Heiland, S., 2015. Mono-Exponential Fitting in T2-Relaxometry: Relevance of Offset and First Echo. PLOS ONE 10, e0145255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145255

Montagnat, M., Chauve, T., Barou, F., Tommasi, A., Beausir, B., Fressengeas, C., 2015. Analysis of Dynamic Recrystallization of Ice from EBSD Orientation Mapping. Front. Earth Sci. 3, 81. https://doi.org/10.3389/feart.2015.00081

Mountziaris, P.M., Mikos, A.G., 2008. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. Tissue Eng. Part B Rev. 14, 179–186. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0038

Mullender, M., El Haj, A.J., Yang, Y., van Duin, M.A., Burger, E.H., Klein-Nulend, J., 2004. Mechanotransduction of bone cellsin vitro: Mechanobiology of bone tissue. Med. Biol. Eng. Comput. 42, 14–21. https://doi.org/10.1007/BF02351006

Muschler, G.F., Nakamoto, C., Griffith, L.G., 2004. Engineering Principles of Clinical Cell-based Tissue Engineering. J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol. 86, 1541–1558. https://doi.org/10.2106/00004623-200407000-00029

Nada, H., Furukawa, Y., 2005. Anisotropy in growth kinetics at interfaces between proton-disordered hexagonal ice and water: A molecular dynamics study using the six-site model of H2O. J. Cryst. Growth 283, 242–256. https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2005.05.057

Napolitano, A.P., Dean, D.M., Man, A.J., Youssef, J., Ho, D.N., Rago, A.P., Lech, M.P., Morgan, J.R., 2007. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. BioTechniques 43, 494–500. https://doi.org/10.2144/000112591

Nield, D.A., Bejan, A., 2006. Convection in porous media, 3rd ed. ed. Springer, New York.

Nishinari, K., Kohyama, K., Williams, P.A., Phillips, G.O., Burchard, W., Ogino, K., 1991. Solution properties of pullulan. Macromolecules 24, 5590–5593. https://doi.org/10.1021/ma00020a017

O'Brien, F., 2004. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. Biomaterials 25, 1077–1086. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00630-6

O'Brien, F.J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Mater. Today 14, 8.

O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V., Gibson, L.J., 2005. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. Biomaterials 26, 433–441. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.052

Oddou, C., Lemaire, T., Pierre, J., David, B., 2010. 3. Hydrodynamics in porous media with applications to tissue engineering, in: Vafai, K. (Ed.), Porous Media: Applications in Biological Systems and Biotechnology. CRC Press, p. 78. https://doi.org/10.1201/9781420065428

Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., Stein, G.S., 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J. Cell. Physiol. 143, 420–430. https://doi.org/10.1002/jcp.1041430304

Padilla, A.M., Ivanisevic, I., Yang, Y., Engers, D., Bogner, R.H., Pikal, M.J., 2011. The Study of Phase Separation in Amorphous Freeze-Dried Systems. Part I: Raman Mapping and Computational Analysis of XRPD Data in Model Polymer Systems. J. Pharm. Sci. 100, 206–222. https://doi.org/10.1002/jps.22269

Pawelec, K.M., Husmann, A., Best, S.M., Cameron, R.E., 2014. A design protocol for tailoring ice-templated scaffold structure. J. R. Soc. Interface 11, 20130958–20130958. https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0958

Penolazzi, L., Lolli, A., Sardelli, L., Angelozzi, M., Lambertini, E., Trombelli, L., Ciarpella, F., Vecchiatini, R., Piva, R., 2016. Establishment of a 3D-dynamic osteoblasts–osteoclasts co-culture model to simulate the jawbone microenvironment in vitro. Life Sci. 152, 82–93. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.035

Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 27–46.

Peppas, N.A., Merrill, E.W., 1977. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks. J. Appl. Polym. Sci. 21, 1763–1770. https://doi.org/10.1002/app.1977.070210704

Piazolo, S., Montagnat, M., Blackford, J.R., 2008. Sub-structure characterization of experimentally and naturally deformed ice using cryo-EBSD. J. Microsc. 230, 509–519. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02014.x

Pietrzyk-Nivau, A., Poirault-Chassac, S., Gandrille, S., Derkaoui, S.-M., Kauskot, A., Letourneur, D., Le Visage, C., Baruch, D., 2015. Three-Dimensional Environment Sustains Hematopoietic Stem Cell Differentiation into Platelet-Producing Megakaryocytes. PLOS ONE 10, e0136652. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136652

Poller, J., Zaloga, J., Schreiber, E., Unterweger, H., Janko, C., Radon, P., Eberbeck, D., Trahms, L., Alexiou, C., Friedrich, R., 2017. Selection of potential iron oxide nanoparticles for breast cancer treatment based on in vitro cytotoxicity and cellular uptake. Int. J. Nanomedicine Volume 12, 3207–3220. https://doi.org/10.2147/IJN.S132369

Porter, B., Zauel, R., Stockman, H., Guldberg, R., Fyhrie, D., 2005. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor. J. Biomech. 38, 543–549. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.04.011

Pothirajan, P., Dorcemus, D., Nukavarapu, S., Kotecha, M., 2014. True MRI assessment of stem cell chondrogenesis in a tissue engineered matrix, in: Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2014 36th Annual International Conference of the IEEE. IEEE, pp. 3933–3936.

Potier, E., Ferreira, E., Andriamanalijaona, R., Pujol, J.-P., Oudina, K., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., 2007. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. Bone 40, 1078–1087. https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.11.024

Probst, A., Spiegel, H.-U., 1997. Cellular Mechanisms of Bone Repair. J. Invest. Surg. 10, 77–86. https://doi.org/10.3109/08941939709032137

Pruppacher, H.R., Klett, J.D., 1980. Microphysics of Clouds and Precipitation. Nature 284, 88–88. https://doi.org/10.1038/284088b0

Qian, L., Zhang, H., 2011. Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials. J. Chem. Technol. Biotechnol. 86, 172–184. https://doi.org/10.1002/jctb.2495

Quarles, L.D., Yohay, D.A., Lever, L.W., Caton, R., Wenstrup, R.J., 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. J. Bone Miner. Res. 7, 683–692.

Rath, S.N., Strobel, L.A., Arkudas, A., Beier, J.P., Maier, A.-K., Greil, P., Horch, R.E., Kneser, U., 2012. Osteoinduction and survival of osteoblasts and bone-marrow stromal cells in 3D biphasic calcium phosphate scaffolds under static and dynamic culture conditions. J. Cell. Mol. Med. 16, 2350–2361. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01545.x

Rauh, J., Milan, F., Günther, K.-P., Stiehler, M., 2011. Bioreactor Systems for Bone Tissue Engineering. Tissue Eng. Part B Rev. 17, 263–280. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0612

Rekha, M.R., Chandra, P.S., 2007. Pullulan as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications: A Perspective. Trends Biomater Artif Organs.

Ribot, E.J., Tournier, C., Aid-Launais, R., Koonjoo, N., Oliveira, H., Trotier, A.J., Rey, S., Wecker, D., Letourneur, D., Amedee Vilamitjana, J., Miraux, S., 2017. 3D anatomical and perfusion MRI for longitudinal evaluation of biomaterials for bone regeneration of femoral bone defect in rats. Sci. Rep. 7, 6100. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06258-0

Rivière, C., 2005. Étude de la filtration de l'aluminium liquide : Modélisation et expérimentation à l'échelle pilote (Génie des Procédés). École Centrale Paris, Châtenay-Malabry.

Rowland, C.R., Colucci, L.A., Guilak, F., 2016. Fabrication of anatomically-shaped cartilage constructs using decellularized cartilage-derived matrix scaffolds. Biomaterials 91, 57–72. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.012

Sachlos, E., Czernuszka, J., 2003. Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. Eur. Cell. Mater. 5, 29–40. https://doi.org/10.22203/eCM.v005a03

Sadtler, K., Singh, A., Wolf, M.T., Wang, X., Pardoll, D.M., Elisseeff, J.H., 2016. Design, clinical translation and immunological response of biomaterials in regenerative medicine. Nat. Rev. Mater. 1, 16040. https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.40

Saleh, F.A., Whyte, M., Genever, P.G., 2011. Effects Of Endothelial Cells On Human Mesenchymal Stem Cell Activity In A Three-Dimensional In Vitro Model. Eur Cell Mater 22, 242–257.

Samavedi, S., Whittington, A.R., Goldstein, A.S., 2013. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. Acta Biomater. 9, 8037–8045. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014

Sang, Y., Prakash, O., Seib, P.A., 2007. Characterization of phosphorylated cross-linked resistant starch by 31P nuclear magnetic resonance (31P NMR) spectroscopy. Carbohydr. Polym. 67, 201–212. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.05.009

Santos, C.P., Lapi, E., Martínez de Villarreal, J., Álvaro-Espinosa, L., Fernández-Barral, A., Barbáchano, A., Domínguez, O., Laughney, A.M., Megías, D., Muñoz, A., Real, F.X., 2019. Urothelial organoids originating from Cd49fhigh mouse stem cells display Notch-dependent differentiation capacity. Nat. Commun. 10, 4407. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12307-1

Schilling, A.F., Filke, S., Brink, S., Korbmacher, H., Amling, M., Rueger, J.M., 2006. Osteoclasts and Biomaterials. Eur. J. Trauma 32, 107–113. https://doi.org/10.1007/s00068-006-6043-1

Schoof, H., Apel, J., Heschel, I., Rau, G., 2001. Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. J. Biomed. Mater. Res. 58, 352–357. https://doi.org/10.1002/jbm.1028

Schremb, M., Tropea, C., 2016. Solidification of supercooled water in the vicinity of a solid wall. Phys. Rev. E 94, 052804. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.94.052804

Sen, M.K., Miclau, T., 2007. Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions? Injury 38, S75–S80. https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.012

Sfeir, C., Ho, L., Doll, B.A., Azari, K., Hollinger, J.O., 2005. Fracture Repair, in: Lieberman, J.R., Friedlaender, G.E. (Eds.), Bone Regeneration and Repair. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 21–44. https://doi.org/10.1385/1-59259-863-3:021

Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., Glogauer, M., 2015. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. Materials 8, 5744–5794. https://doi.org/10.3390/ma8095273

Shibkov, A.A., Golovin, Yu.I., Zheltov, M.A., Korolev, A.A., Leonov, A.A., 2003. Morphology diagram of nonequilibrium patterns of ice crystals growing in supercooled water. Phys. Stat. Mech. Its Appl. 319, 65–79. https://doi.org/10.1016/S0378-4371(02)01517-0

Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N., Mikos, A.G., 2002. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. J. Biomed. Mater. Res. 62, 136–148. https://doi.org/10.1002/jbm.10150

St John, T.A., Vaccaro, A.R., Sah, A.P., Schaefer, M., Berta, S.C., Albert, T., Hilibrand, A., 2003. Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. Am. J. Orthop. Belle Mead NJ 32, 18–23.

Taguchi, K., Ogawa, R., Migita, M., Hanawa, H., Ito, H., Orimo, H., 2005. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 6.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.-R., Ueno, Y., Zheng, Y.-W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y., Taniguchi, H., 2013. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. Nature 499, 481–484. https://doi.org/10.1038/nature12271

Tao, Y., Zhang, R., Xu, W., Bai, Z., Zhou, Y., Zhao, S., Xu, Y., Yu, D., 2016. Rheological behavior and microstructure of release-controlled hydrogels based on xanthan gum crosslinked with sodium trimetaphosphate. Food Hydrocoll. 52, 923–933. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.006

Taylor, J.C., Cuff, S.E., Leger, J.P.L., Morra, A., Anderson, G.I., 2002. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 17, 321–330.

Thébaud, N.-B., Pierron, D., Bareille, R., Le Visage, C., Letourneur, D., Bordenave, L., 2007. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: A pre-requisite for vascular tissue engineering. J. Mater. Sci. Mater. Med. 18, 339–345. https://doi.org/10.1007/s10856-006-0698-1

Thibeaux, R., Duval, H., Smaniotto, B., Vennat, E., Néron, D., David, B., 2019. Assessment of the interplay between scaffold geometry, induced shear stresses, and cell proliferation within a packed bed perfusion bioreactor. Biotechnol. Prog. https://doi.org/10.1002/btpr.2880

Treloar, L.R.G., 1975. The physics of rubber elasticity, Third Ediiton. ed. Oxford University Press, Oxford, [Eng].

Vali, G., 2008. Repeatability and randomness in heterogeneous freezing nucleation. Atmospheric Chem. Phys. 8, 5017–5031. https://doi.org/10.5194/acp-8-5017-2008

Vali, G., 1994. Freezing Rate Due to Heterogeneous Nucleation. J. Atmospheric Sci. 51, 1843–1856. https://doi.org/10.1175/1520-0469(1994)051<1843:FRDTHN>2.0.CO;2

Volkmer, E., Drosse, I., Otto, S., Stangelmayer, A., Stengele, M., Kallukalam, B.C., Mutschler, W., Schieker, M., 2008. Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue

Engineering of Bone. Tissue Eng. Part A 14, 1331–1340. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0231
Voronov, R., VanGordon, S., Sikavitsas, V.I., Papavassiliou, D.V., 2010. Computational modeling of flow-induced shear stresses within 3D salt-leached porous scaffolds imaged via micro-CT. J. Biomech. 43, 1279–1286. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.01.007
Warren, P.B., Stepanek, F., 2008. Wall Shear Rate Distribution for Flow in Random Sphere Packings. Phys. Rev. Lett. 100. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.084501
Whang, K., Thomas, C.H., Healy, K.E., Nuber, G., 1995. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. Polymer 36, 837–842. https://doi.org/10.1016/0032-3861(95)93115-3
Winter, H.H., Chambon, F., 1986. Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point. J. Rheol. 30, 367–382. https://doi.org/10.1122/1.549853
Wittkowske, C., Reilly, G.C., Lacroix, D., Perrault, C.M., 2016. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. Front. Bioeng. Biotechnol. 4. https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00087
Xia, Z., Triffitt, J.T., 2006. A review on macrophage responses to biomaterials. Biomed. Mater. 1, R1–R9. https://doi.org/10.1088/1748-6041/1/1/R01
Xu, H., Othman, S.F., Magin, R.L., 2008. Monitoring Tissue Engineering Using Magnetic Resonance Imaging. J. Biosci. Bioeng. 106, 515–527. https://doi.org/10.1263/jbb.106.515
Yannas, I.V., Burke, J.F., Gordon, P.L., Huang, C., Rubenstein, R.H., 1980. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. J. Biomed. Mater. Res. 14, 107–132. https://doi.org/10.1002/jbm.820140203
Yeatts, A.B., Fisher, J.P., 2011. Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. Bone 48, 171–181. https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.09.138
Yoshida, H., Hatakeyama, T., Hatakeyama, H., 1993. Characterization of water in polysaccharide hydrogels by DSC. J. Therm. Anal. 40, 483–489. https://doi.org/10.1007/BF02546617
Yu, Y.Y., Lieu, S., Lu, C., Miclau, T., Marcucio, R.S., Colnot, C., 2010. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair 11.
Zhang, H., Cooper, A.I., 2007. Aligned Porous Structures by Directional Freezing. Adv. Mater. 19, 1529–1533. https://doi.org/10.1002/adma.200700154
Zhang, H., Hussain, I., Brust, M., Butler, M.F., Rannard, S.P., Cooper, A.I., 2005. Aligned two- and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles. Nat. Mater. 4, 787–793. https://doi.org/10.1038/nmat1487
Zysset, P.K., Guo, X.E., Ho, C.E., Goldstein, S.A., 1999. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. J. Biomech. 8.