



HAL
open science

Développement d'un système de culture perfusé pour l'élaboration de modèles de tissus osseux

Mikhael Hadida

► **To cite this version:**

Mikhael Hadida. Développement d'un système de culture perfusé pour l'élaboration de modèles de tissus osseux. Autre. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSEM031 . tel-02956471

HAL Id: tel-02956471

<https://theses.hal.science/tel-02956471v1>

Submitted on 2 Oct 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.

NNT : 2019LYSEM031



THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'École des Mines de Saint-Etienne

École Doctorale N° 488
Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité de doctorat : Mécanique et Ingénierie

Soutenue publiquement le 06/12/2019, par :

Mikhael Hadida

**Développement d'un système de culture
perfusé pour l'élaboration de modèles
de tissu osseux**

Devant le jury composé de :

Rapporteurs

BARDET Claire, MC, HDR, EA2496, Faculté de Chirurgie Dentaire, Univ. Paris **LENG Jacques**, CR CNRS, HDR, Laboratoire du Futur, CNRS/Solvay/Univ. Bordeaux

Examineurs.trices

VICO Laurence, DR, HDR, Univ Lyon, INSERM U1059, Lab. Biol. Intégrée Tissu Osseux **DESCROIX Stéphanie**, DR CNRS, HDR, Institut Curie UMR 168

PETITE Hervé, DR INSERM, HDR, Laboratoire B3OA, Université de paris, CNRS, UMR 7052, INSERM, U1273

MARCHAT David, CR Mines, Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose

Invité.es

SEPULVEDA Julia, PhD, Elvsys – Microfluidics innovation center
SCHOUTTETEN Laëtitia, PhD, Pulsalys, SATT Lyon Saint Etienne

Spécialités doctorales	Responsables :	Spécialités doctorales	Responsables
SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX	K. Wolski Directeur de recherche	MATHEMATIQUES APPLIQUEES	O. Roustant, Maître-assistant
MECANIQUE ET INGENIERIE	S. Drapier, professeur	INFORMATIQUE	O. Boissier, Professeur
GENIE DES PROCÉDES	F. Gruy, Maître de recherche	SCIENCES DES IMAGES ET DES FORMES	JC. Pinoli, Professeur
SCIENCES DE LA TERRE	B. Guy, Directeur de recherche	GENIE INDUSTRIEL	X. Delorme, Maître assistant
SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT	D. Graillet, Directeur de recherche	MICROELECTRONIQUE	Ph. Lalevée, Professeur

EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

ABSI	Nabil	CR	Génie industriel	CMP
AUGUSTO	Vincent	CR	Image, Vision, Signal	CIS
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BADEL	Pierre	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2	Informatique	FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR	Sciences et génie des matériaux	SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BEIGBEDER	Michel	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
BLAYAC	Sylvain	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BONNEFOY	Olivier	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
CAMEIRAO	Ana	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
CHRISTIE	Frédéric	PR	Science et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	MR	Sciences des Images et des Formes	SPIN
DEGEORGE	Jean-Michel	MA(MDC)	Génie industriel	Fayol
DELAFOSSÉ	David	PR0	Sciences et génie des matériaux	SMS
DELORME	Xavier	MA(MDC)	Génie industriel	FAYOL
DESRAYAUD	Christophe	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DJENIZIAN	Thierry	PR	Science et génie des matériaux	CMP
DOUCE	Sandrine	PR2	Sciences de gestion	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FAUCHEU	Jenny	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
FAVERGEON	Loïc	CR	Génie des Procédés	SPIN
FEILLET	Dominique	PR1	Génie Industriel	CMP
FOREST	Valérie	MA(MDC)	Génie des Procédés	CIS
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Sciences de la Terre	SPIN
GAVET	Yann	MA(MDC)	Sciences des Images et des Formes	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GONDRAN	Natacha	MA(MDC)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
GONZALEZ FELIU	Jesus	MA(MDC)	Sciences économiques	FAYOL
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
HAN	Woo-Suck	MR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NEUBERT	Gilles			FAYOL
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre	Ingénieur de recherche	Mécanique et ingénierie	CMP
NORTIER	Patrice	PR1	Génie des Procédés	SPIN
O CONNOR	Rodney Philip	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
OWENS	Rosin	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
PERES	Véronique	MR	Génie des Procédés	SPIN
PICARD	Gauthier	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
PIJOLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Sciences des Images et des Formes	SPIN
POURCHEZ	Jérémy	MR	Génie des Procédés	CIS
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)	Mathématiques appliquées	FAYOL
SANAUR	Sébastien	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	PR2	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	DR	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR0	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

Au Dr. Danielle HADIDA

Table des matières

Résumé	9
Introduction	11
Enjeux.....	11
Plan de la thèse.....	15
I. Revue de littérature.....	19
I.1 Résumé de la revue	19
I.2 Revue : “Strategy for achieving standardized tissue models”	21
II Développement et conception du système de culture	47
II.1 Les systèmes de culture perfusés : état des lieux et fonctions clés.....	47
II.1.1 Limites des systèmes commerciaux et des prototypes actuels	47
II.1.2 Le contrôle de l’environnement fluide	49
II.1.3 L’accès à l’information	52
II.2 Conception du dispositif de culture et d’ensemencement cellulaire	55
II.2.1 Choix techniques généraux de suivi des cultures et contraintes associées	55
II.2.2 Ergonomie de la chambre de culture et contraintes de design associées.....	56
II.3 Contrôle de l’environnement fluide	59
II.3.1 Choix du design général du support de culture	59
II.3.2. Design et validation numérique du réseau fluide en amont et en aval du support de culture	61
II.4 Automatisation.....	72
II.5 Prototype et perspectives d’évolution	74
II.5.1 Chambre de culture.....	74
II.5.2 Architecture du support de culture	76
II.5.3 Évolutions du système	79
III. Validation et valorisation scientifique et industrielle	83
III.1 Projet ESA- <i>BONUS</i>	84
III.1.2 Validation biologique du système	85
III.1.3 Application à l’évaluation biologique des effets de l’irisine.....	90
III.1.4 Partenariats et perspectives industrielles.....	92
III.2 Projet Pulsalys <i>STREAM</i>	93
III.2.1 Présentation du projet.....	93
III.2.2 Propriété intellectuelle.....	93
III.2.3 Les étapes du projet.....	94
Conclusion générale.....	97
Références.....	101

ANNEXE: rapport d'évaluation du projet ESA BONUS109

Tables des illustrations

Figure 1 Monument au souris de laboratoire.....	12
Figure 2 Unité de remodelage osseux.....	13
Figure 3 Bioréacteur à perfusion.....	14
Figure 4 Distribution du cisaillement et des lignes de courant dans un matériau présentant des macropores de taille hétérogène.	20
Figure 5 Bioréacteurs industriels.	47
Figure 6 Prototypes de laboratoire	48
Figure 7 Bioréacteur U-CUP de CELLEC Biotek AG.....	49
Figure 8 Importance de la configuration des systèmes d'étanchéité au niveau des supports de culture.....	50
Figure 9 Influence de la géométrie interne de la chambre de culture sur la circulation du milieu de culture.....	51
Figure 10 Profils de pression générés par différents types de pompes.	52
Figure 11 Microscopie optique, profondeur de champ et distance de travail.	53
Figure 12 Principe de la microscopie à fluorescence sous excitation à 1 photon.	54
Figure 13 Principe de la microscopie à fluorescence sous excitation à 2 photons.	54
Figure 14 Types de microscopes à fluorescence.	55
Figure 15 Exemple de schéma général du système de culture perfusée.....	56
Figure 16 Configurations classiques en microscopie.	56
Figure 17 Design préliminaire de la chambre de culture.....	57
Figure 18 Distances de travail de différents types d'objectifs de microscope.....	58
Figure 19 Schémas en coupe de la chambre de culture (prototype).....	59
Figure 20 Influence des propriétés du support sur l'environnement fluide.....	60
Figure 21 Choix de l'architecture des supports de culture.	60
Figure 22 Zones du circuit fluide à valider en amont du motif d'alimentation.....	61
Figure 23 Validation mécanique <i>in silico</i> de la jonction entre le perçage traversant et les canaux du réseau primaire.	63
Figure 24 Répartition de l'écoulement dans un coude d'un rayon de courbure de 2 mm en fonction du débit.	63
Figure 25 Répartition du débit dans le canal en fonction de la distance par rapport à la fin du cintrage du coude.	64
Figure 26 Présentation des designs inspirés des PPFC et des puces microfluidiques	65
Figure 27 Exemples de motifs d'alimentation conçus sur la base des principes PPFC et microfluidique.....	65
Figure 28 Modélisation des lignes de courant de l'écoulement pour différents designs du motif d'alimentation.....	66
Figure 29 Contraintes de cisaillement dans les canaux du support de culture en fonction du débit et du design du motif d'alimentation.....	68
Figure 30 Distribution des contraintes de cisaillement sur l'ensemble de la surface de culture.	69
Figure 31 Distribution des lignes de courant et des contraintes de cisaillement en l'absence de collecteur.....	70

Figure 32 Influence des paramètres géométriques du collecteur sur l'écoulement.....	71
Figure 33 Influence des paramètres v et h du collecteur sur la distribution de Q dans le support de culture.....	71
Figure 34 Exemples de fonctions clés du montage hydraulique.....	73
Figure 35 Intégration d'électrovalves 5:4.....	74
Figure 36 Prototype de la chambre de culture.....	75
Figure 37 Assemblage de chambres en unité.....	75
Figure 38 Optimisation du design de la chambre de culture.	76
Figure 39 Support de culture pour l'étude des différentes gammes d'influence des paramètres « cisaillement » et « vitesse » sur le comportement d'un type cellulaire.	76
Figure 40 Comportement de l'écoulement dans des supports de culture basés sur des géométries triplement périodiques de surface minimale (TPMS).	77
Figure 41 Contrôle des différents niveaux architecturaux des supports de culture céramique.	78
Figure 42 Microtopographie et ensemencement	79
Figure 43 Structure du WP1200 du projet BONUS.....	85
Figure 44 Modèle de support <i>de culture</i> avec éléments dissociables.	87
Figure 45 Stratégie de criblage « traditionnelle » de l'environnement fluide par modulation du débit.....	88
Figure 46 Stratégie de criblage optimisée de l'environnement fluide.	89
Figure 47 Cartographie de l'influence des paramètres v et h sur le comportement de cellules primaires	90
Figure 48 Evaluation des effets de l'irisine sur la différenciation ostéoblastique et ostéocytaire.	91
Figure 49 Evaluation des effets potentiel de protection de l'irisine contre les conséquences de la dégradation de l'environnement fluide.....	92
Figure 50 Taux de croissance composé de l'organ-on-chip entre 2017 et 2023.	95

Résumé

L'utilisation des modèles animaux reste la norme en biologie (« *gold standard* ») pour la recherche fondamentale comme pour les tests de nouveaux médicaments. Cependant, ces méthodes ont un coût rédhibitoire en ressources humaines et financières, en temps, mais également un poids éthique extrêmement élevés. De plus, les différences physiologiques et métaboliques majeures entre les modèles animaux et l'être humain entraînent de faibles taux de transférabilité pour les applications humaines. Le secrétaire d'État américain à la santé, Mike Leavitt, déclarait en 2007 : « à l'heure actuelle, neuf médicaments expérimentaux sur dix échouent au stade des essais cliniques, car nous sommes incapables de prédire précisément leurs effets chez les êtres humains à partir des études en laboratoire et sur les animaux ». Pour ces raisons, la recherche en biologie se dirige vers un changement de paradigme des modèles animaux vers des modèles *in vitro* de tissus et/ou d'organes miniaturisés générés à partir de cellules humaines.

Pour l'heure, les modèles de tissus osseux restent rudimentaires et ne permettent toujours pas la culture à l'échelle de temps du remodelage osseux (plusieurs mois). Les systèmes de culture perfusés tridimensionnels sont les candidats les plus prometteurs. Cependant, les conditions de culture optimales pour stimuler l'activité, la différenciation et la durée de vie des cellules osseuses restent inconnus, et les protocoles de culture varient de façon significative entre les équipes de recherche. Cette thèse a pour objectif de développer un système capable d'établir ces conditions, et qui sera par conséquent en mesure de proposer un modèle de tissu osseux standardisé exploitable notamment dans les cadres de la biologie exploratoire, de la recherche pharmaceutique et des études précliniques.

Le premier chapitre de la thèse s'articule autour de l'analyse des raisons pour lesquelles les conditions de culture « optimales » restent inconnues malgré deux décennies d'expérimentation avec des systèmes de culture perfusés. Notamment, les variables de contrainte de cisaillement et de vitesse de circulation locale, qui régissent l'environnement mécanique et chimique des cellules, restent des facteurs de confusion rendant impossible la détermination des relations entre des paramètres tels que le débit de perfusion et le comportement cellulaire observé. La détermination de ces relations est également compliquée par l'utilisation systématique de supports de culture possédant un réseau macroporeux hétérogène, qui génèrent de large gammes de valeurs de stimuli chimiques et mécaniques, ce qui empêche l'identification des valeurs de cisaillement et de vitesse de circulation auxquelles les cellules semblent être sensibles. À partir de cette analyse, nous proposons dans une revue de littérature une nouvelle interprétation de résultats connus, une discussion à propos des risques associés aux modèles standards (e.g., expériences en 2D, modèles de Goldstein et de Weinbaum) et une stratégie d'ajustement des protocoles expérimentaux permettant de corréliser efficacement les paramètres sélectionnés avec les résultats biologiques obtenus.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit synthétise la conception d'un système innovant de culture de tissus osseux répondant à un cahier des charges précis, notamment en termes de contrôle de l'environnement, d'accès à l'information et d'automatisation. Le design de la chambre de culture, inspiré de puces microfluidiques, permet d'obtenir des contraintes de cisaillement contrôlées et homogènes sur l'ensemble de la surface de culture, tout en étant compatible avec une observation en continu de l'activité cellulaire par des techniques de microscopie photonique, fonctionnalité qui n'existe pas actuellement. L'intégration de la chambre de culture dans un montage d'électrovannes connectées permet de réduire significativement les interventions humaines, et les risques associés,

notamment pour la réalisation des étapes clés que sont l'ensemencement, les prélèvements ou encore le remplacement du milieu de culture.

Le dernier chapitre de cette thèse détaille les différentes stratégies de validation et de valorisation du système développé. Le contrôle rigoureux de l'environnement mécanique et la possibilité de suivre en direct l'évolution des fonctions biologiques par microscopie à fluorescence, auparavant réservés aux modèles bidimensionnels, font de ce système de culture un candidat prometteur pour répondre au besoin de modèles standardisés de tissu osseux. Le développement du système en tant qu'outil d'évaluation de molécules d'intérêt pour la biologie osseuse a notamment été retenu lors d'un appel à projet de l'Agence Spatiale Européenne (ESA) dans le cadre de la recherche sur l'ostéosarcopénie des spationautes. En parallèle, l'opportunité de prolongation du projet vers le développement d'un outil commercialisable et exploitable dans les sphères académiques comme industrielles (e.g., validation de dispositifs médicaux, études précliniques, laboratoires pharmaceutiques) ouverte par le dépôt d'un brevet est actuellement explorée avec l'appui de la SATT PULSALYS.

Introduction

Enjeux

Aussi différents des êtres humains soient-ils, des animaux tels que les rats et les souris partagent néanmoins de nombreuses similarités physiologiques et génétiques avec l'Homme. Pour cette raison, les expériences sur les animaux apportent des informations précieuses sur les maladies humaines, et contribuent grandement à l'avancée des sciences médicales. Les bases de ce raisonnement, notamment décrit il y a 2400 ans par Aristote, font aujourd'hui du modèle animal un outil incontournable dans la quasi-totalité des domaines biomédicaux, tels que la biologie fondamentale, l'immunologie, l'oncologie et l'étude des maladies infectieuses (Agnihotri et al. 2013).

Néanmoins, les problèmes liés à l'extrapolation directe d'informations issues de la recherche animale sur l'humain sont inévitables. Malgré les similitudes, les différences inter-espèces (e.g., anatomie, fonction et structure des organes, métabolisme des médicaments ou toxines, mécanismes de réparation de l'ADN...) conduisent régulièrement à des impasses. En effet, les modèles animaux sont extrêmement efficaces pour prédire la non-toxicité d'une molécule pour l'Homme, comme en témoigne le nombre remarquablement faible d'accidents en essais cliniques de phase I (seuls deux décès en UE et aux États-Unis depuis 2001). En revanche, l'expérimentation animale ne permet pas de prédire de façon fiable l'efficacité thérapeutique d'une molécule pour l'humain, ce qui se traduit par un taux d'échec aux essais cliniques de 94% des médicaments testés. L'ancien directeur du National Cancer Institute Richard Klausner déclarait en 1998 « *Nous avons soigné le cancer chez la souris depuis des décennies, et ça n'a simplement pas marché pour l'Homme* » (Cimons et al. 1998). D'autres part, les coûts et durées des expériences sur les animaux sont prohibitivement élevés. La norme actuelle pour tester la cancérogénicité d'un produit chimique est un essai biologique sur des rongeurs prenant jusqu'à cinq ans entre la planification, l'évaluation et l'analyse, pour un coût pouvant atteindre plus de 4 millions de dollars par substance testée. De plus, et malgré l'application des principes éthiques rigoureux qui encadrent l'expérimentation animale (cf. paragraphe suivant), les estimations du nombre d'animaux tués annuellement dans les laboratoires à travers le monde varient entre 100 et 150 millions (European commission 2019; Lush Prize 2014), soulignant le lourd tribut éthique de cette méthodologie. En 2013, l'Académie Russe des Sciences érige un monument symbolisant la gratitude de l'Humanité vis-à-vis des souris ainsi sacrifiées (Figure 1).

Parmi ces principes, la théorie des 3R (Replace, Reduce, Refine) élaborée en 1959, pose les bases d'une première démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale, avec pour objectifs de la remplacer lorsque cela est possible, de la réduire au maximum, et de raffiner la méthodologie employée. Ces principes ont été transposés en droit français en février 2013 dans les termes suivants :

« *Les soins et l'utilisation d'animaux vivants à des fins scientifiques sont régis par des principes de remplacement, de réduction et de raffinement établis sur le plan international. [...] L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques ou éducatives devrait donc être envisagée uniquement lorsqu'il n'existe pas de méthode alternative n'impliquant pas l'utilisation d'animaux.* »

La culture *in vitro* de cellules souches humaines différenciées en cellules de différents tissus ou organes est une alternative pertinente aux expérimentations animales. Elle permet de reproduire certaines structures ou fonctions biologiques, et offre donc la possibilité d'étudier certains mécanismes biologiques ou encore l'impact de principes actifs sur ces mécanismes.



Figure 1 | Monument aux souris de laboratoire.

Ce monument commémore le sacrifice de la souris dans la recherche (Novossibirsk, Russie)

Pour certains organes, comme le foie, le rein ou la peau, cette technologie est suffisamment avancée pour des applications pratiques. Des modèles tridimensionnels de peau générés à base de cellules humaines, tels que développés par la société x-cellr8 ([x-cellr8](#)), sont par exemple déjà utilisés pour mesurer la réponse dermique à diverses formulations cosmétiques. De même, des tissus modèles de foie et de rein sont déjà utilisés dans un contexte préclinique pour mesurer les toxicités rénale et hépatique de molécules d'intérêt ([Organovo](#)), ou pour simuler différentes pathologies ([Mimetas](#)).

Les modèles de tissus osseux, en revanche, restent rudimentaires : souvent bidimensionnels, ne permettant pas la culture cellulaire à l'échelle de temps du remodelage osseux (plusieurs mois) ([Kenkre and Bassett 2018](#)) ou encore n'intégrant généralement qu'un seul type cellulaire ([Bouet et al. 2015b](#)) parmi les nombreux types composants l'unité de remodelage de base (**Figure 2**). Or, les fonctions du tissu osseux reposent sur l'interaction de ces différents types cellulaires:

Les ostéoblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse dont le rôle est d'élaborer le tissu osseux immature (tissu ostéoïde) et de permettre sa calcification en élaborant des protéines initiant la cristallisation (sialoprotéine osseuse (BSP) / phosphoprotéines) et des enzymes permettant l'entretien de la calcification (e.g., phosphatase alcaline).

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Ces cellules dégradent et digèrent la matrice extra-cellulaire osseuse, composée essentiellement de phosphates de calcium et de collagène, en sécrétant de l'acide et de la collagénase.

Après un certain nombre de divisions, les ostéoblastes peuvent s'entourer de matrice-extracellulaire et se différencier en ostéocytes. Les ostéocytes communiquent entre eux par des

prolongements cytoplasmiques, qui forment un réseau occupant la porosité lacuno-canaliculaire. Ces cellules occupent un rôle clé dans la régulation des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques, notamment par la perception et transduction des stimuli mécaniques (Thèse G.Bouet 2012).

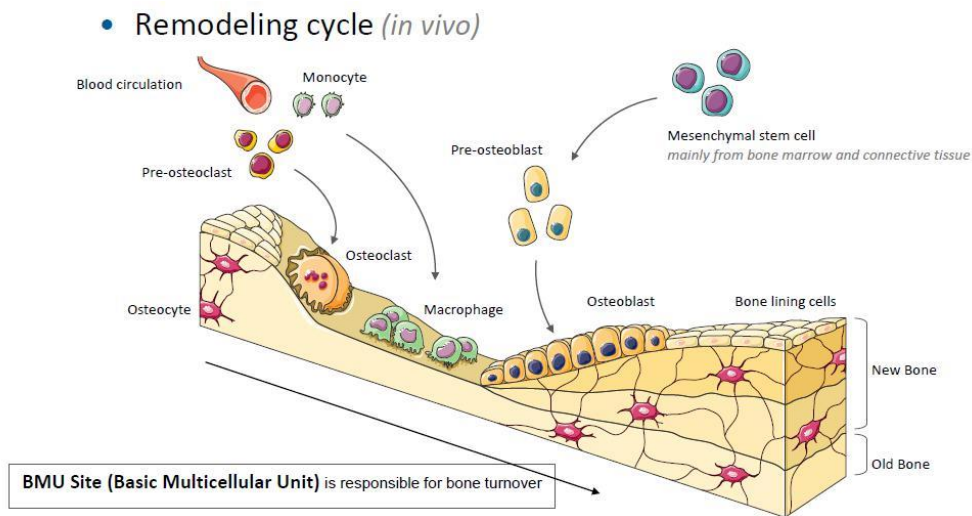


Figure 2 | Unité de remodelage osseux
(Smart Servier Medical Art)

Établir un modèle de tissu osseux viable nécessite par exemple de pouvoir maintenir fonctionnelles des cellules de lignées ostéoblastique dans un environnement tridimensionnel jusqu'à leur différenciation en ostéocytes. Des modèles plus complexes consistent à co-cultiver plusieurs de ces types cellulaires ensemble (cf. Chapitre I section 5.2.4 de la revue).

Les premières stratégies en ingénierie tissulaire osseuse tridimensionnelle (3D) sont basées sur des méthodes conventionnelles en puits de culture, c'est-à-dire avec un milieu statique, nous parlerons de « culture statique ». Des cellules sontensemencées sur des supports de culture poreux, qui sont ensuite disposés sur une plaque multi-puits pour une durée prédéterminée (De-Paula et al. 2019; Singh et al. 2019). Cette stratégie de culture statique entraîne une surconcentration des cellules à la périphérie du support de culture du fait de l'absence de circulation des nutriments et de l'oxygène et de leur faible diffusion au centre du support de culture. Cette accumulation de matrice et de cellules finit d'appauvrir le centre du matériau en nutriments et entraîne la mort des cellules qui s'y trouvent (De Giglio et al. 2018; Ma et al. 2018).

Les bioréacteurs dynamiques génèrent une circulation artificielle du milieu de culture à l'aide de mouvement, pompe, turbine, etc. (pour revue (Rauh et al. 2011)). La convection forcée qui en découle améliore les échanges entre le milieu de culture et les cellules présentes dans le support de culture. Parmi eux, les systèmes perfusés (dont le concept est illustré **Figure 3**) permettent, en théorie (cf. Chapitre II.1.2), de faire circuler le milieu de culture à travers le réseau macroporeux du support. Outre le transport de masse, la convection forcée par la perfusion exerce également une contrainte de cisaillement fluide sur les cellules. Globalement, il a été montré que ces systèmes perfusés permettent une meilleure viabilité cellulaire, une expression accrue du phénotype ostéogénique, et une meilleure distribution de matrice extracellulaire minéralisée par rapport aux autres systèmes de culture (Bancroft et al. 2003; Bancroft et al. 2002; Gomes et al. 2003; Sikavitsas et al. 2002). Les bioréacteurs perfusés semblent donc être les meilleurs candidats pour le développement de modèles

de tissu osseux, et sont aujourd'hui les systèmes les plus couramment utilisés en ingénierie tissulaire osseuse (Bouet et al. 2015c; Hadida and Marchat 2019).

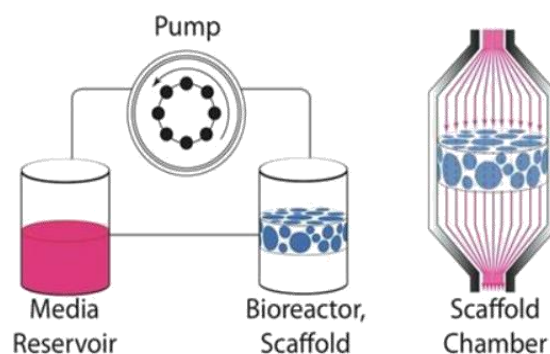


Figure 3 | Bioréacteur à perfusion.

Le système perfusé est composé d'une pompe, d'un réservoir de milieu de culture et d'une chambre accueillant le support de culture. Le raccord à pression (ou « press-fit ») du support de culture permet d'assurer que le milieu de culture perfuse bien à travers le réseau macroporeux du support.

Néanmoins, malgré l'utilisation aujourd'hui répandue de ces systèmes perfusés et le nombre considérable de designs proposés par la littérature (voir Chapitre II.1), il n'existe pas de standards permettant d'obtenir des résultats reproductibles d'un système à l'autre. Le nombre élevé de paramètres significatifs et corrélés (e.g., le débit de perfusion, les contraintes mécaniques, la diffusion de l'oxygène, la vitesse de convection des nutriments et cytokines, la taille des pores, la porosité du support de culture) rend l'étude systématique de l'influence des conditions de cultures particulièrement complexe, poussant les équipes de recherche à définir leurs protocoles de culture de façon empirique, voire arbitraire.

Le projet développé dans cette thèse a pour finalité de fournir aux acteurs académiques et industriels un système innovant de culture en 3D perfusé permettant la culture maîtrisée, standardisée et simplifiée de tissus osseux modèles fabriqués *in vitro* sur des supports de culture. Outre la possibilité d'ajuster et de contrôler en temps réel les conditions de culture des cellules (e.g., environnements chimique et mécanique), ce système a également pour but de faciliter l'acquisition, toujours en temps réel, des données relatives à l'activité cellulaire via la quantification de certains facteurs circulants dans le milieu de culture (e.g., oxygène, glucose, acide lactique) ou l'imagerie (e.g., microscopie par absorption biphotonique). Les applications de cet outil ne se limitent ainsi pas qu'à la compréhension des mécanismes de la physiologie osseuse, il permet également d'envisager un renforcement des capacités d'évaluation de substances chimiques (e.g., toxicologie, pharmacologie, épidémiologie), ou encore de biomatériaux développés dans le contexte de la médecine régénérative ou des prothèses orthopédiques, et ce dans des conditions standardisées. De tels modèles représentent des outils de choix pour faire face aux enjeux de santé publique associés à une population sédentaire et vieillissante, de plus en plus touchée par des troubles du système osseux.

L'objectif général de cette thèse était de développer un outil qui permettrait la culture contrôlée, standardisée et simplifiée de cellules osseuses afin de déterminer l'influence respective du transport de masse et des contraintes de cisaillement fluide. Plus précisément, les trois objectifs suivants ont été définis:

1. La méta-analyse des modèles de tissu osseux *in vitro* et l'établissement d'un cahier des charges pour un système de culture pertinent pour ces modèles.
2. La conception et la validation mécanique d'un système de culture perfusé répondant au cahier des charges défini.

3. La définition d'une stratégie de validation scientifique (et plus particulièrement biologique) et de valorisation industrielle du système conçu.

Plan de la thèse

Cette thèse est agencée en trois chapitres, qui reprennent les objectifs précédemment définis.

Chapitre I : Le premier chapitre de la thèse s'articule autour de l'analyse des raisons pour lesquelles les conditions de culture « optimales » restent inconnues malgré deux décennies d'expérimentation avec des systèmes de culture perfusés. Les objectifs de cette analyse sont de proposer une stratégie permettant de s'affranchir des obstacles identifiés afin de faciliter le développement de modèles de tissu osseux standardisés, et de préparer la conception d'un système de culture adapté à la détermination de ces conditions. Les résultats de ces recherches seront présentés sous la forme d'une revue de littérature.

Chapitre II : Le deuxième chapitre synthétise la conception du système de culture, notamment en termes de contrôle de l'environnement, d'accès à l'information et d'automatisation, la validation numérique, l'évolution, et le prototypage des itérations du système.

Chapitre III : Le dernier chapitre de cette thèse détaille les différentes stratégies de validation et de valorisation mises en place, assurant la continuité du projet.

Chapitre I. Revue de la Littérature

I. Revue de littérature

I.1 Résumé de la revue

Les systèmes de culture dynamiques, c'est-à-dire qui mettent en mouvement le milieu de culture, permettent une meilleure circulation des nutriments, de l'oxygène et des déchets cellulaires. Cette circulation est nécessaire pour atteindre une durée de culture suffisamment longue pour reproduire les mécanismes du remodelage osseux dans des supports de culture de taille pertinente d'un point de vue tissulaire (Allori et al. 2008). Parmi ces systèmes, les bioréacteurs perfusés permettent de faire circuler le milieu de culture à travers les supports, assurant ainsi un environnement plus homogène et une meilleure viabilité cellulaire en augmentant les transports de nutriments, de métabolites et d'oxygène vers et depuis les cellules (Gaspar et al. 2012).

En plus du contrôle et de la *surveillance* de nombreux paramètres de culture tout au long de la croissance cellulaire (e.g., pH, température, pression, quantité de nutriments...), les bioréacteurs perfusés permettent également d'étudier l'impact de stimuli mécaniques sur le comportement et le devenir cellulaire (Bouet et al. 2015c).

En effet, la circulation du milieu à travers le support de culture génère un cisaillement hydrodynamique, qui est un facteur connu de la régulation du développement et de la fonctionnalité du tissu osseux (Grayson et al. 2011).

Lorsqu'un os est soumis à une contrainte mécanique, le fluide interstitiel est éjecté des zones de forte compression, puis re-perfused dans ces zones lors de la décharge (Rauh et al. 2011). In vivo, les os sont constamment soumis à des contraintes mécaniques provoquées par les contractions musculaires, les mouvements corporels ou la gravité, et les configurations d'écoulement qui en résultent modulent l'environnement mécanique et chimique des cellules (Tovar-Lopez et al. 2014).

Ces écoulements sont fondamentaux dans le développement du tissu osseux, impactant la prolifération, distribution et différenciation cellulaire (Bancroft et al. 2002; Holtorf et al. 2005; Sikavitsas et al. 2005).

En conséquence, les écoulements générés dans les bioréacteurs perfusés présentent un intérêt particulier, et sont étudiés depuis les années 90 dans le but de mettre au point des protocoles optimisés pour la fabrication de tissu osseux in vitro. Malgré les connaissances accumulées, la pertinence des gammes de cisaillement recommandées (e.g., 0,8 Pa – 3 Pa dans le modèle ostéocytaire développé par Weinbaum (Weinbaum et al. 1994), 0,5 – 2 Pa dans les cultures 2D (Wittkowske et al. 2016)) reste controversée, les protocoles de culture optimisés pour une application donnée (e.g., différenciation ou prolifération d'un type cellulaire) n'existent pas, et les modèles de tissu osseux restent significativement sous-développés vis-à-vis d'autres organes comme la peau, le foie ou les reins (Scheinpflug et al. 2018).

Cette revue propose une approche pluridisciplinaire des paramètres ayant une incidence sur le devenir cellulaire dans les systèmes perfusés, et des limites des méthodologies actuelles, afin de permettre le développement de modèles de tissus osseux fonctionnels suffisamment fiables et pertinents pour être exploités dans des contextes de recherche biologique et préclinique. Nous explorons notamment comment des paramètres tels que le débit de perfusion, les contraintes de cisaillement ou encore les niveaux de transport de masse induits par la perfusion restent des facteurs de confusion, empêchant la détermination des relations entre les conditions de culture et le comportement des cellules. En effet, les contraintes de cisaillement et les vitesses locales de circulation du milieu découlant d'un débit de

perfusion donné dépendent des caractéristiques architecturales du support de culture, et définissent de manière indépendante les environnements mécanique et chimique des cellules. Dans ce cadre, nous proposons une nouvelle interprétation de plusieurs résultats de la littérature, une discussion sur les risques liés à l'utilisation de modèles standards (e.g., expériences réalisées en 2D type « ibidi Flow Chambers μ -Slide », modèles de Goldstein et Weinbaum), ainsi qu'une stratégie d'ajustement des protocoles expérimentaux afin de corrélérer efficacement les paramètres sélectionnés avec les résultats biologiques obtenus.

La détermination de conditions de cultures ostéogéniques généralisables pour un type cellulaire donné nécessite notamment un changement d'objectif scientifique, de la détermination du débit optimal à celle de la combinaison optimale de valeurs de cisaillement et de vitesse de circulation locales. Ce changement de paradigme implique un contrôle plus rigoureux de l'environnement cellulaire.

En effet, lorsque des supports de culture présentent des hétérogénéités géométriques conséquentes, tels que celles observées dans l'article de Maes et al. (Maes et al. 2012) (Figure 4A), il est expérimentalement impossible de corrélérer le comportement cellulaire aux propriétés nominales du support de culture (e.g., diamètre moyen des macropores). Les supports de culture traditionnels génèrent également de larges distributions de valeurs de cisaillement et de vitesses de circulation (Figure 4B) ce qui rend impossible la détermination des valeurs réellement à l'origine des comportements cellulaires observés.

En outre, la réponse ostéogénique à un environnement dynamique est définie par de nombreux autres paramètres souvent négligés, tels que la microarchitecture des supports de culture, leur chimie de surface, ou la composition du milieu. Ces paramètres induisent une forte variabilité inter-études, ou même inter-échantillons, et empêche la généralisation des résultats obtenus.

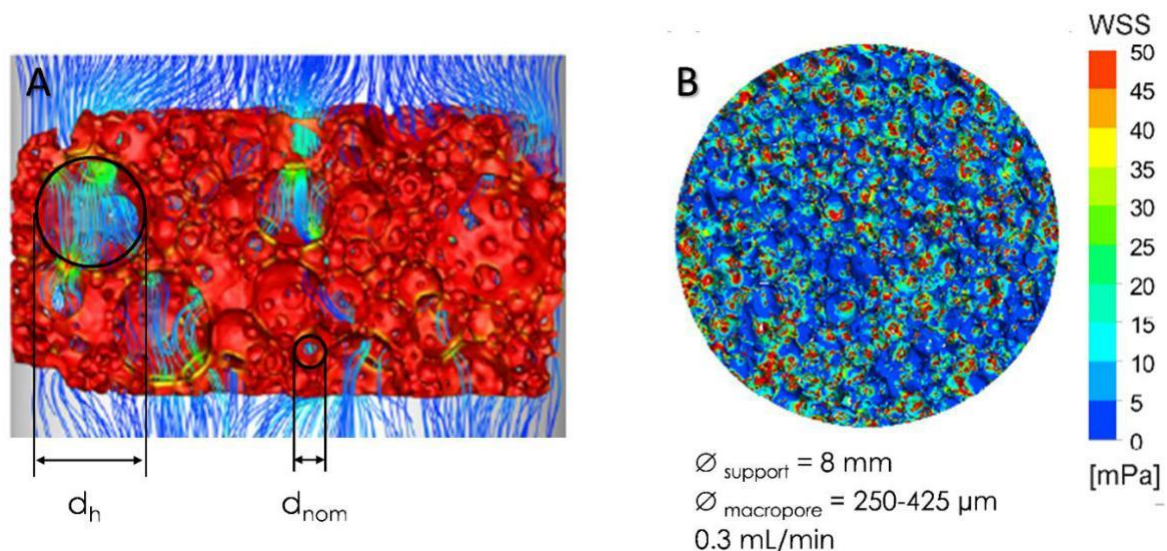


Figure 4 | Distribution du cisaillement et des lignes de courant dans un matériau présentant des macropores de tailles hétérogènes.

(A) Lignes de courant (ANSYS Fluent, Canonsburg, Etats-Unis) à travers la géométrie semi-aléatoire d'un support de culture obtenu par un procédé de bullage (foaming) puis imagé par microtomographie. Il apparaît clairement que les défauts du support de culture (pores de diamètre d_h très supérieur au diamètre nominal d_{nom}) définissent l'environnement fluide global dans le support de culture (Maes et al. 2012), (B) Simulation des contraintes de cisaillement dans un support de culture perfusé à 0,3 mL/min. La répartition des contraintes dans la coupe médiane du matériau apparaît très hétérogène (Liu et al. 2018).

Les systèmes de culture perfusés dédiés à une application spécifique, comme quantifier l'impact de l'environnement fluide, doivent être conçus avec une approche dite « descendante » (« top-down » en anglais). Dans ce cas, les caractéristiques techniques du système devraient être définies en amont

à l'aide de simulations numériques détaillant les contraintes de cisaillement fluide, les vitesses de circulation locales ainsi que les lignes de courant de l'écoulement dans l'ensemble du volume de culture, sur toute la plage de débit envisagée, et en utilisant les géométries réelles des supports de culture. Les supports de culture, le milieu, et tous les composants du système en contact avec les cellules doivent également avoir des propriétés contrôlées et ne pas impacter le comportement cellulaire, ou seulement de façon connue. Lorsqu'elle est possible, l'automatisation des systèmes assure un haut niveau de répétabilité, réduit les sources d'erreur humaine, les risques de contamination, allège la charge de travail, et ouvre de nouvelles opportunités d'acquisition de données, et donc de compréhension des mécanismes biologiques, en combinaison avec des capteurs d'activité cellulaire.

Parvenir à un contrôle fin des paramètres de culture, et ainsi de l'environnement cellulaire, permettra d'améliorer notre compréhension des relations entre les divers paramètres de culture et les réponses cellulaires en ingénierie tissulaire osseuse. Cette base solide de connaissances « universelles », i.e., comparables les unes avec les autres, ou standard, permettra d'orienter le développement de nouvelles stratégies d'approche (i) des maladies osseuses, (ii) du remodelage et de la régénération du tissu osseux, et (iii) des systèmes *in vitro* physiologiques combinant plusieurs organes ou tissus modèles (« multi-organ » et « body-on-chip » en anglais) permettant l'établissement d'interactions systémiques.

I.2 Revue : “Strategy for achieving standardized tissue models”

Biotechnology and Bioengineering. 2019;1–21, DOI: 10.1002/bit.2717

ABSTRACT: Reliably producing functional *in vitro* organ models, such as organ-on-chip systems, has the potential to considerably advance biology research, drug development time and resource efficiency. However, despite the ongoing major progress in the field, three-dimensional bone tissue models remain elusive. In this review, we specifically investigate the control of perfusion flow effects as the missing link between isolated culture systems and scientifically exploitable bone models and propose a roadmap toward this goal.

Keywords. *In vitro* 3D models, bone, tissue engineering, perfusion bioreactor.

Strategy for achieving standardized bone models

Mikhael Hadida  | David Marchat 

Mines Saint- Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, Saint- Etienne, France

Correspondence

David Marchat, Mines Saint- Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, F- 42023 Saint- Etienne, France.
Email: marchat@emse.fr

Abstract

Reliably producing functional in vitro organ models, such as organ- on- chip systems, has the potential to considerably advance biology research, drug development time, and resource efficiency. However, despite the ongoing major progress in the field, three- dimensional bone tissue models remain elusive. In this review, we specifically investigate the control of perfusion flow effects as the missing link between isolated culture systems and scientifically exploitable bone models and propose a roadmap toward this goal.

KEYWORDS

bone, in vitro 3D models, perfusion bioreactor, tissue engineering

1 | INTRODUCTION

Animal models remain the current gold standard in preclinical drug screening and proof- of- concept studies for innovative treatments, but differences in physiology and metabolism result in low transfer-ability rates for human applications (Scheinflug et al., 2018). However, major advances in tissue engineering over the past decades have led to the emergence of numerous in vitro organ models dedicated to explorative biology. Regarding bone, the simplest method to obtain bone tissue constructs is to statically culture progenitor cells in porous scaffolds with osteogenic differentiation medium. However, static culture methods rely exclusively on diffusive transfer of soluble substances, such as cell wastes, nutrients, oxygen, and cytokines, creating strong concentration gradients between the fluid- construct boundary interface and scaffold core (Bancroft et al., 2002; Goldstein, Juarez, Helmke, Gustin, & Mikos, 2001). Depletion of nutrients and waste accumulation in the scaffold core often result in cell death (Keogh, O'Brien, & Daly, 2010; Ratcliffe

& Niklason, 2002). Their convective transfer, which is necessary to achieve studies long enough in regard to the duration of the bone modeling cycle in anatomically relevant sized constructs, can be provided by dynamic bioreactors introducing fluid movement (Allori et al., 2008). Extensive information about bioreactors, their various designs (e.g. spinner flasks, rotating wall vessels, mechanical strain,

perfusion), and their use can be found in several interesting reviews (Rauh, Milan, Gunther, & Stiehler, 2011; Szpalski, Sagebin, Barbaro, & Warren, 2013; Yeatts & Fisher, 2011). Among those designs, perfusion bioreactors offer the possibility to force the medium through the scaffold, facilitating a more homogeneous environment across the construct volume rather than just improving convection at its surface and provide the best results in terms of overall cell viability and homogeneity (Gaspar, Gomide, & Monteiro, 2012). In addition to controlling and monitoring many culture parameters throughout tissue growth in vitro (e.g., pH, nutrient and waste concentrations), perfusion bioreactors offer a framework to study the role of mechanical cues on cell fate (Bouet, Marchat, Cruel, Malaval, & Vico, 2015). Indeed, although the primary role of perfusion has been to increase the mass transport, the interstitial flow of medium has an additional effect of providing hydrodynamic shear stress, a known regulatory factor of bone development and function (Grayson et al., 2011). Hydrodynamic shear stress (τ in Pa) is the tangential force applied by a fluid on a surface. Any fluid moving along a solid surface will incur shear stress on this surface.

When a mechanical load is applied to bone, interstitial fluid is forced out of the areas of high compressive deformation and flows back when the load is removed (Rauh et al., 2011). In vivo, bone is constantly exposed to stimulation by gravity, muscular contraction, and body movements, generating complex flow patterns that impact

cells' mechanical and chemical environments (Tovar- Lopez, Dominguez- Hernandez, Diez- Garcia, & Araujo- Monsalvo, 2014). Dynamic bioreactors have shown that these flow effects are paramount to the proper development of bone tissue, positively increasing the expression levels of nitric oxide, prostaglandin E2, and osteoblast- specific proteins, such as bone sialoprotein, osteopontin, osteocalcin, and type I collagen, along with cell proliferation, distribution, and differentiation (McCoy & O'Brien, 2010; Stiehler et al., 2009; Wittkowske, Reilly, Lacroix, & Perrault, 2016).

Perfusion experiments have been performed since the 1990s (el Haj, Minter, Rawlinson, Suswillo, & Lanyon, 1990; Glowacki, Mizuno, & Greenberger, 1998; Mueller, Mizuno, Gerstenfeld, & Glowacki, 1999) with numerous cell types (e.g., primary cells, cell lines, mesenchymal stem cells; Wittkowske et al., 2016), scaffold materials (e.g., organic, inorganic, metals), scaffold manufacturing techniques

(e.g., foaming, salt- leaching, mesh, bone machining, free- form shaping; Bouet, Marchat, et al., 2015), and many custom- made perfusion reactors (Gardel, Serra, Reis, & Gomes, 2014; Gaspar et al., 2012). However, compared to organs such as lung, liver or kidney, in vitro bone tissue models appear to be underdeveloped, with few published models focusing on certain physiological parameters (e.g., load, hypoxia) instead of aiming to comprehensively emulate bone biology (Scheinflug et al., 2018).

This review aims to offer a broad and multidisciplinary approach to the parameters impacting cell fate in 3D perfused systems to help achieve in vitro bone tissue models with the level of consistency and reliability necessary to the development of functional models suitable for biological and preclinical applications.

2 | KEY PARAMETERS IN PERFUSION BIOREACTORS

2.1 | Flow rate, circulation velocity, and shear stress

Perfusion bioreactors supply cells with culture medium at a selected flow rate, which is the volume of medium perfused through the scaffold in a given amount of time. However, cells do not respond directly to flow rate values but to the resulting chemical and mechanical environments.

As stated, the culture medium circulation velocity defines the convective transfer of soluble substances. This velocity defines mass transport rates across the scaffold in association with diffusion phenomena, therefore playing a major role in defining the chemical environment of cells. Regarding mechanical stimuli, they are assumed to be mainly transmitted to bone cells through fluid flow and matrix deformation (Goggin, Zygalakis, Oreffo, & Schneider, 2016; Gusmao & Belangero, 2009; Owan et al., 1997; Paul, Malhotra, & Muller, 2018; You, Weinbaum, Cowin, & Schaffler, 2004). Simplified relationships between flow rate, circulation velocity, and shear stress are reported in the following sections.

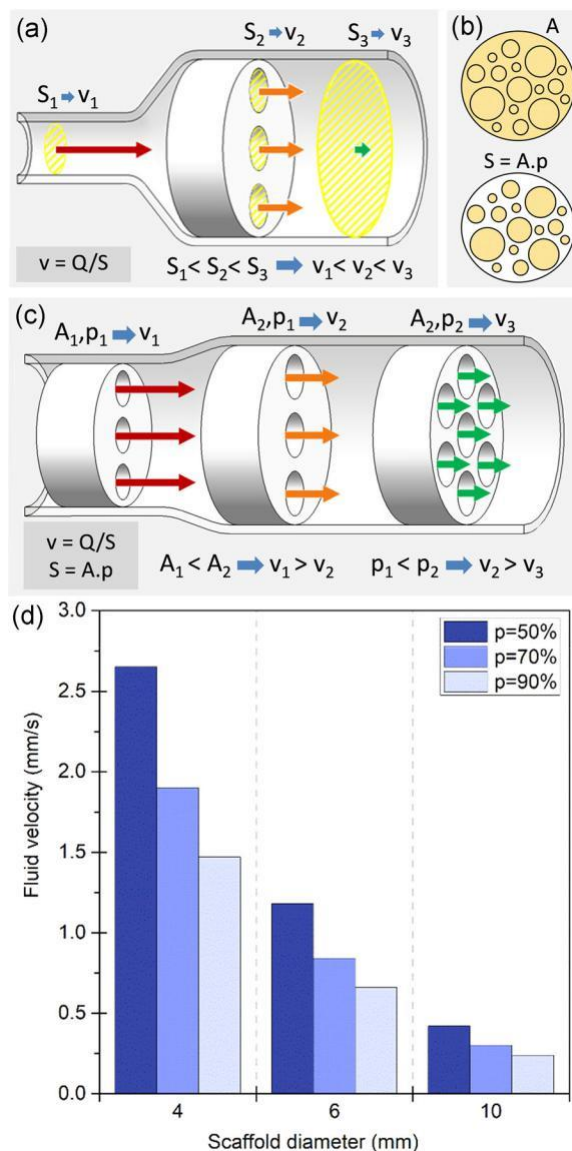


FIGURE 1 Influence of scaffold properties on flow velocity. (a) For a given flow rate, the fluid velocity (v) is inversely proportional to the total open cross- section (S) it is flowing through, represented in yellow cross- hatches. (b) The average open cross- sectional surface (S) is determined by the total cross- sectional area of the scaffold (A) and its porosity (p). A and S are successively represented in cross- hatches. (c) Scaffolds of different sizes and porosities have different open cross- sectional surfaces, thus generating different velocities for the same flow rate. (d) Average circulation velocity in mm/s for a circular scaffold perfused at a flow rate of 1 ml/min for different scaffold diameters (D in mm) and values of porosity (p), calculated using Equation (3)

2.1.1 | Circulation velocity

Applied to homogeneous and unidirectional perfusion, the simplified continuity equation states that:

$$Q = v \cdot S, \quad (1)$$

where Q is the flow rate and v is the average velocity of the fluid flowing through an open cross- section of surface S (Figure 1a).

The same flow rate will generate different velocities depending on the surface of the open cross-section it is flowing through.

In a porous scaffold of cross-section of A and porosity percentage p , the average surface of the open cross-section along the scaffold (Figure 1b) is defined by the following:

$$S = A \cdot p. \tag{2}$$

Thus, the average fluid circulation velocity within the scaffold is directly tied to its dimensions and porosity (Figure 1c) through the relationship:

$$v = Q / (A \cdot p). \tag{3}$$

Figure 1d shows the average velocity generated by a 1 ml/min flow rate through circular scaffolds for different common values of scaffold diameter and porosity percentage. For the same flow rate, differences in scaffold size and porosities can easily generate a tenfold difference in average velocity.

2.1.2 | Shear stress

When the thickness of the extracellular matrix (ECM) and cell layers is significantly smaller than the pore diameter, we can use the shear stress applied to the scaffold walls to estimate the flow-induced shear stress applied to the cells. In cylindrical channels, wall shear stress τ can be extrapolated from the liquid dynamic viscosity μ , the diameter of the channel d (Figure 2a), v through the Poiseuille–Hagen law:

By locally approximating scaffold pores to cylinder fragments, with d being the pore diameter, we obtain the following relationships:

$$\tau = (8 \cdot \mu \cdot v) / d. \tag{4}$$

which directly connects local shear stresses to the selected flow rate, medium viscosity, scaffold dimensions, pore sizes, and porosity percentage. Figure 2b shows the average shear stresses generated by a 1 ml/min flow rate through 1 cm² cross-section scaffolds for different common values of pore diameters and porosity percentage. For this same flow rate, the variations in scaffold internal architecture produce average shear stresses ranging from 3.7 to 26.7 mPa.

2.2 | Scaffold architectural features defining flow effects

How a given flow rate will translate into mass transport rates and shear stress depends on a combination of the scaffold architectural features and bioreactor characteristics (Du, Ushida, & Furukawa, 2015). The architectural features orienting cell fate by defining flow-induced mechanical and chemical environments are summarized below.

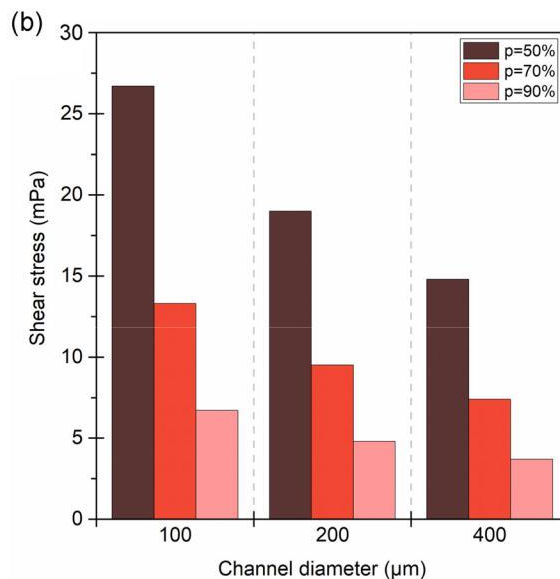
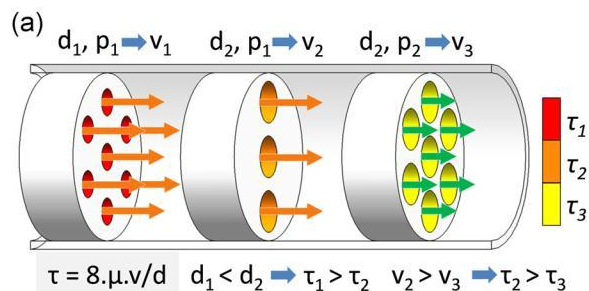


FIGURE 2 Impact of scaffold properties on flow-induced shear stress. (a) Shear stress τ inside the channels is proportional to fluid velocity v and inversely proportional to the channel diameter d . Shear stress is presented in decreasing order from τ_1 (max) to τ_3 (min). (b) Approximation of shear stress in mPa in a scaffold of a cross-section $A = 1 \text{ cm}^2$ perfused at a flow rate of 1 ml/min, and different values of porosity (p) and pore diameter (d in μm), calculated using Equation (3)

2.2.1 | Shape and dimensions

Scaffolds can range from a few millimeters in size (Grayson et al., 2008; Jagodzinski et al., 2008) to several centimeters (Li, Tang, Lu, & Dai, 2009; Liu et al., 2012), greatly varying the area of the cross-section exposed to flow. Variations in scaffold shape and bioreactor chamber designs (especially if and how the scaffold is sealed) also define preferential flow pathways. For example, culture medium can sometimes bypass the scaffold porosity (Figure 3a) or be forced in specific flow configurations (Figure 3b). Figure 3c shows a bioreactor where proper perfusion is ensured by press-fitting the scaffold into a custom silicone cassette.

2.2.2 | Porosity

The macroscopic structure produced by a network of pores is often described using porosity values, expressed as a percentage of the volume of voids over the total volume of the scaffold and often ranging from 50% to 90% (Gariboldi & Best, 2015). Porosity can be

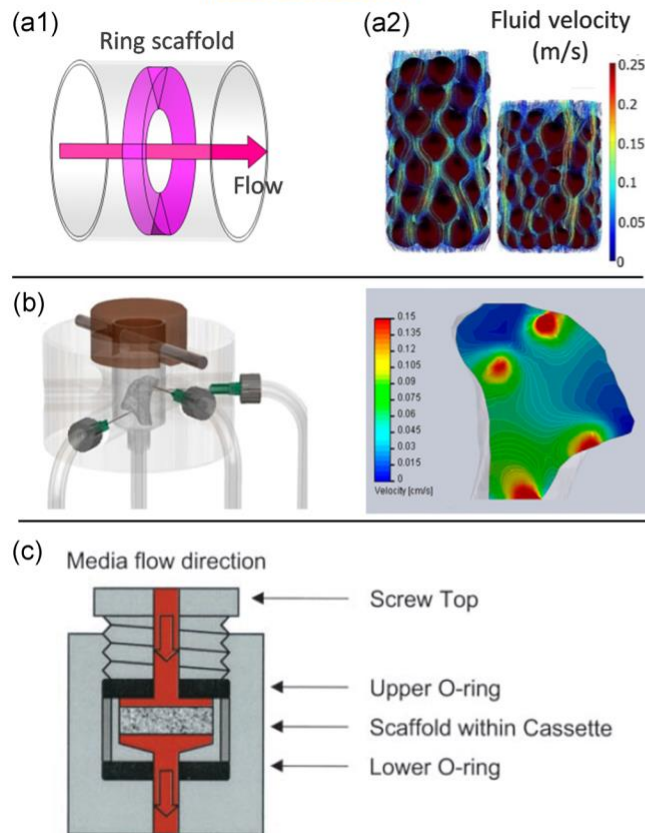


FIGURE 3 Impact of scaffold and culture chamber designs on flow pathways. Shape and dimensions of the scaffold with respect to the chamber design greatly modify the area and the volume of the scaffold truly perfused; culture medium can flow (a) preferentially all around the scaffold (a1) from the middle (Liu et al., 2012) or (a2) at the periphery (streamline simulation; Cruel et al., 2015), (b) at specific location (Grayson et al., 2010) or (c) through the entire construct (Bancroft, Sikavitsas, & Mikos, 2003)

open, closed, or blind-ended (Figure 4a). However, only open porosity is directly conducive to tissue in growth. Porosity is only one of the numerous parameters that may be used to describe the porous architecture of a scaffold (e.g., interconnectivity, pore orientation, tortuosity, pore and interconnection shape). Used alone, porosity is a poor predictor of biological responses. In particular, mass transport and shear stress values, which are key factors affecting cell fate and tissue development, cannot be evaluated based on the porosity value alone; other architectural parameters must be provided (Ashworth, Best, & Cameron, 2014; Bohner, Loosli, Baroud, & Lacroix, 2011).

2.2.3 | Macropore size and geometry

As stated in Section 2.1, for a given velocity, shear stress is inversely proportional to the channel diameter (d). Therefore, pore size is a significant parameter to know and control (if possible) to determine the relationship between cell behavior and flow effects. Unfortunately, mainly due to the manufacturing techniques used to produce scaffolds, their porous architectures are always more complex than an arrangement of

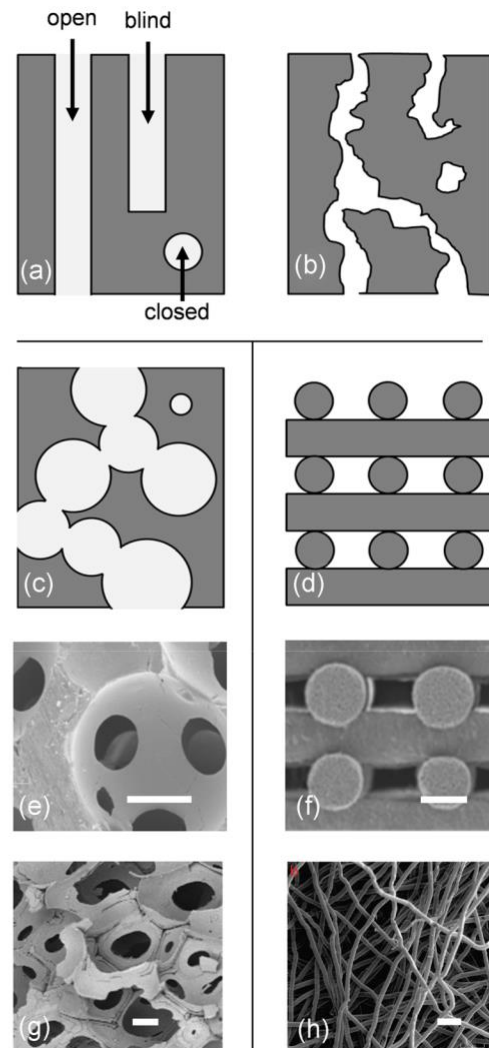


FIGURE 4 Macroporous structure. Representation of the types of pore space depending on their connection to the surface of the material (open, closed, and blind-ended; Ashworth et al., 2014) for (a) an ideal structure composed of channels, (b) a tortuous porous network and a scaffold composed of (c) spherical interconnected pores or (d) rods. (e) and (g) show corresponding images of scaffolds composed of interconnected macropores (obtained by PMMA skeleton and organic foam impregnation, respectively), (f) and (h) show scaffolds composed of intertwined fibers obtained by robocasting (from Martinez-Vazquez, Pajares, Guiberteau, and Miranda, 2014) and fiber spunbonding (from VanGordon et al., 2011), respectively. Scale bar = 200 μm

straight channels, as schematized in Figure 4b–d (Bouet, Marchat, et al., 2015). Random macropore distribution, size, orientation, shape, and so forth are predominant in scaffolds used for bone tissue engineering (BTE), which mainly consist of interconnected pores (Figure 4e, g) or intertwined fibers (Figure 4f, h). Macroporosity is almost systematically approximated as spherical with a unique dimension, the “mean diameter,” or in the best case, a diameter distribution (Bohner et al., 2011). This simplification is not representative of the actual macropore geometry and does not include the interconnection features, which are defining parameters for local circulation velocities and shear stresses.

3 | FLOW EFFECTS

3.1 | Significance of flowrate

Perfusion studies introduced flowrate as a defining parameter of cell behavior. Studies exploring different flowrates in a setup show, first that cell responses to flow perfusion is value dependent (Bancroft et al., 2002; Cartmell, Porter, Garcia, & Guldborg, 2003; Grayson et al., 2008; Li et al., 2009; Sonnaert et al., 2017), and second that cells can be surprisingly sensitive to moderate variations in flowrate (Cartmell et al., 2003; Su, Wang, & Chou, 2014). Bancroft et al. (2002) cultivated rat marrow stromal osteoblasts in perfused fiber mesh titanium scaffolds and found that an increase in flowrate from 0.3 ml/min to 1 ml/min generated an over six-fold increase in the

calcium content of cultured scaffolds. Conversely, in Cartmell et al. (2003), increasing the flow rate from 0.1 to 0.2 ml/min caused a four-fold decrease in the total DNA. These studies illustrate that cell behavior, especially viability and differentiation rates, can be significantly altered by subtle changes in flowrates.

Cell behavior is not related to flowrate in a linear manner. In the same study by Bancroft et al. (2002), increasing the flowrate from 1 ml/min to 3 ml/min "only" doubled the calcium content. In Cartmell et al. (2003), no significant change in DNA content or OCN and Runx2 expression was observed between 0.01 ml and 0.1 ml/min, whereas a sharp decrease in DNA and an increase in OCN and Runx2 were observed at 0.2 ml/min (Figure 5a). These results suggest that cells are particularly responsive to ranges and thresholds of stimuli.

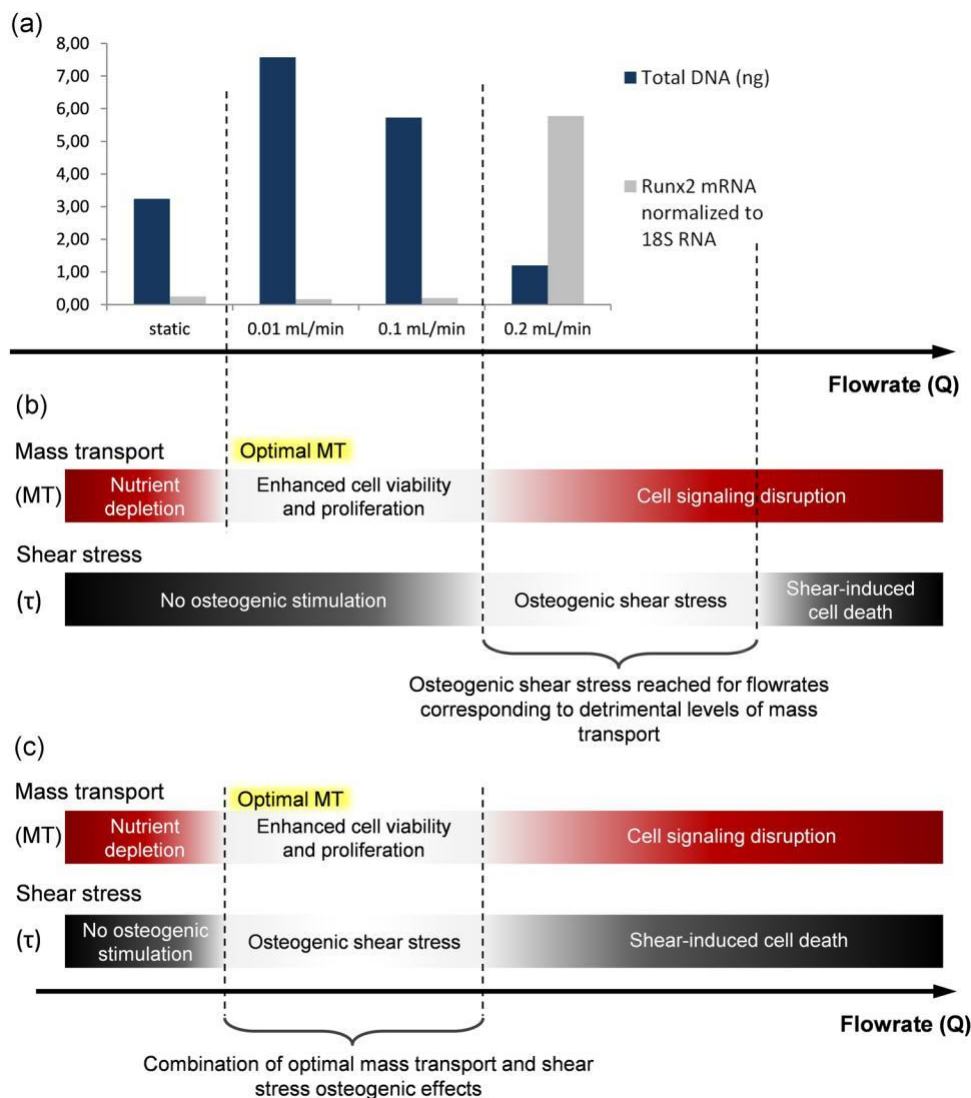


FIGURE 5 Influence of the combination of shear stress and mass transport on cells fate. (a) Total DNA content (cell proliferation) and Runx2 gene expression measured after 7 days of culture of MC3T3-E1 immature osteoblast-like cells in human trabecular bone scaffold under static or dynamic medium flow conditions (from Cartmell et al., 2003). (b) The existence of thresholds for mass transport rates and shear stresses visualized here could explain the marked changes observed between perfusion flowrates of 0.1 and 0.2 ml/min. (c) Appropriate levels of shear stress can have significant osteogenic effects, but higher values cause cell damage and detachment (McCoy & O'Brien, 2010). In this hypothesis, achieving higher shear stresses at a given flowrate would allow benefiting simultaneously from the osteogenic effects of shear stress and mass transport

3.2 | Confusion surrounding flowrate

Given the significance of flowrate values, a priority in the field of *in vitro* BTE is determining the “optimal flow rate” for osteogenesis. However, as described in Section 3.1, studies aiming to assess flow rate effects obtain contradictory results regarding the optimal perfusion rate and describe different effects for identical flow rates. For instance, using a static culture as a control, Gomes, Holtorf, Reis, and Mikos (2006) and Jaasma & O'Brien (2008) describe a significant increase and significant decrease in the cell population for a 1 ml/min flow rate, respectively.

On the whole, the flowrate value remains a confounding variable scattered across four orders of magnitude (from 2 μ l/min; Bouet, Cruet, et al., 2015 to 60 ml/min; Chen et al., 2016) without clear patterns between the selected flowrate and observed osteogenic effects. Selected flowrates in perfusion studies do not necessarily rely on experimental design and are often seemingly arbitrarily fixed to 0.1 or 1 ml/min (Allori et al., 2016; Gardel et al., 2014; Gomes et al., 2006; Holtorf, Datta, Jansen, & Mikos, 2005; Jaasma & O'Brien, 2008; Sinlapabodin, Amomsudthiwat, Damrongsakul, & Kanokpanont, 2016; Van Gordon et al., 2011) or refer to different setups. For example, Baas, Kuiper, Yang, Wood, and El Haj (2010) quote one of their articles from 1990 to support the choice of a 0.1 ml/min flowrate, suggesting that this flowrate may have provided consistently good results over two decades. However, the scaffolds used in Baas et al. are of different dimensions and internal architecture than those in their reference study (Baas et al., 2010; el Haj et al., 1990).

As explained in Section 2.1, for a given flowrate, differences in the scaffolds architecture result in different local fluid speeds and shear stresses. The combined influence of both should be systematically considered when interpreting perfusion study results. In Cartmell et al. (2003), the upregulated expression of OCN and Runx2, which are characteristic responses to shear stress exposure (Wittkowske et al., 2016), was observed at 0.2 ml/min (Figure 5a). According to the authors, the sharp decrease in cell viability also observed for this flowrate may be linked to the increased shear stress. However, the osteogenic levels of shear stress are not usually correlated with a decrease in cell viability (Bancroft et al., 2002; Chen et al., 2016; Farack et al., 2011; Grayson et al., 2008; Holtorf, Sheffield, Ambrose, Jansen, & Mikos, 2005; Kleinhan et al., 2015; Li et al., 2009; Liu et al., 2012; Su et al., 2014), and we hypothesize that the shear stress level required to elicit an osteogenic cell response in the scaffolds used is reached only for flowrates inducing mass transport levels already detrimental to cells (Figure 5b). Although relevant mass transport rates enhance cell viability and proliferation, excessively high rates have inhibitory effects that may be linked to cell signaling disruptions (Grayson et al., 2011; Li et al., 2009). This idea would be consistent with the structure of the scaffolds used, which have a relatively high porosity (82%) and an unusually large mean pore size (645 μ m), resulting in lower shear stresses at a given flow rate (see Section 2.1). Based on this observation, the protocol parameters could be adjusted by using scaffolds with a smaller pore size or a more viscous culture medium (c.f. Section 5.1.3) to obtain a better combination of shear stress and mass transport effects, as proposed in Figure 5c.

Therefore, approaching flow rate in terms of resulting circulation velocities and shear stresses would offer additional insight into result interpretation and understanding why perfusion can reduce cell viability (Bartnikowski, Klein, Melchels, & Woodruff, 2014; Cartmell et al., 2003; Jaasma & O'Brien, 2008; McCoy, Jungreuthmayer, & O'Brien, 2012). Similarly, studies investigating optimal scaffold pore sizes and porosity (Chen et al., 2016; Gomes et al., 2006; McCoy et al., 2012) in perfusion bioreactors should consider that the observed results may not actually be only related to the scaffold features but also to the corresponding shear stress and mass transport resulting from the perfusion of this scaffold at the selected flow rate (see also Section 4.4.1). Thus, a challenging target in BTE is the determination of these optimal shear stress and circulation velocity ranges for a given cell type.

4 | OBSTACLES IN DEFINING OPTIMAL FLOW EFFECTS

In the context of the ongoing pursuit of optimal operating conditions that will yield the desired levels of tissue performance or functioning, the determination of optimal shear stress and circulation velocity ranges for a given cell type constitutes both a challenging target and a major potential milestone in BTE.

4.1 | Using reference shear stress values

Fixing or identifying optimal shear stress and circulation velocity in complex 3D systems from approximated variables only (e.g., pore size, flow homogeneity in the scaffold) is arduous. Therefore, the BTE community primarily relies on different values from the literature.

4.1.1 | Biomimetics

In 1994, Weinbaum, Cowin, and Zeng (1994) proposed a model for the *in vivo* mechanical excitation of osteocytes in which physiological shear stresses have been determined in the range of 0.8–3 Pa. Despite more recent models (Min, Lee, Lee, & Hong, 2018; Wu et al., 2016), this now well-known range has become the reference value for *in vivo* shear stress BTE. In this model, a trabecula is submitted to a combination of axial and bending dynamic loads, causing displacement of intracanalicular fluid, which in turn induces shear stress τ_p along the membrane of osteocytic processes (Figure 6a). To estimate the range of shear stress at osteocyte membranes (dendrite and cell body), the authors proposed a simplified model of the mineralized matrix, representing only the lacunar-canalicular porosity as a periodic unit cell (Figure 6b). In this model, the 0.8–3 Pa range corresponds to the loading cycle maximum shear stress on the osteocyte membrane close to the osteon wall ($Y = 1$), that is, where the deformation is maximal, for different load cycle combinations (see Figure 6c).

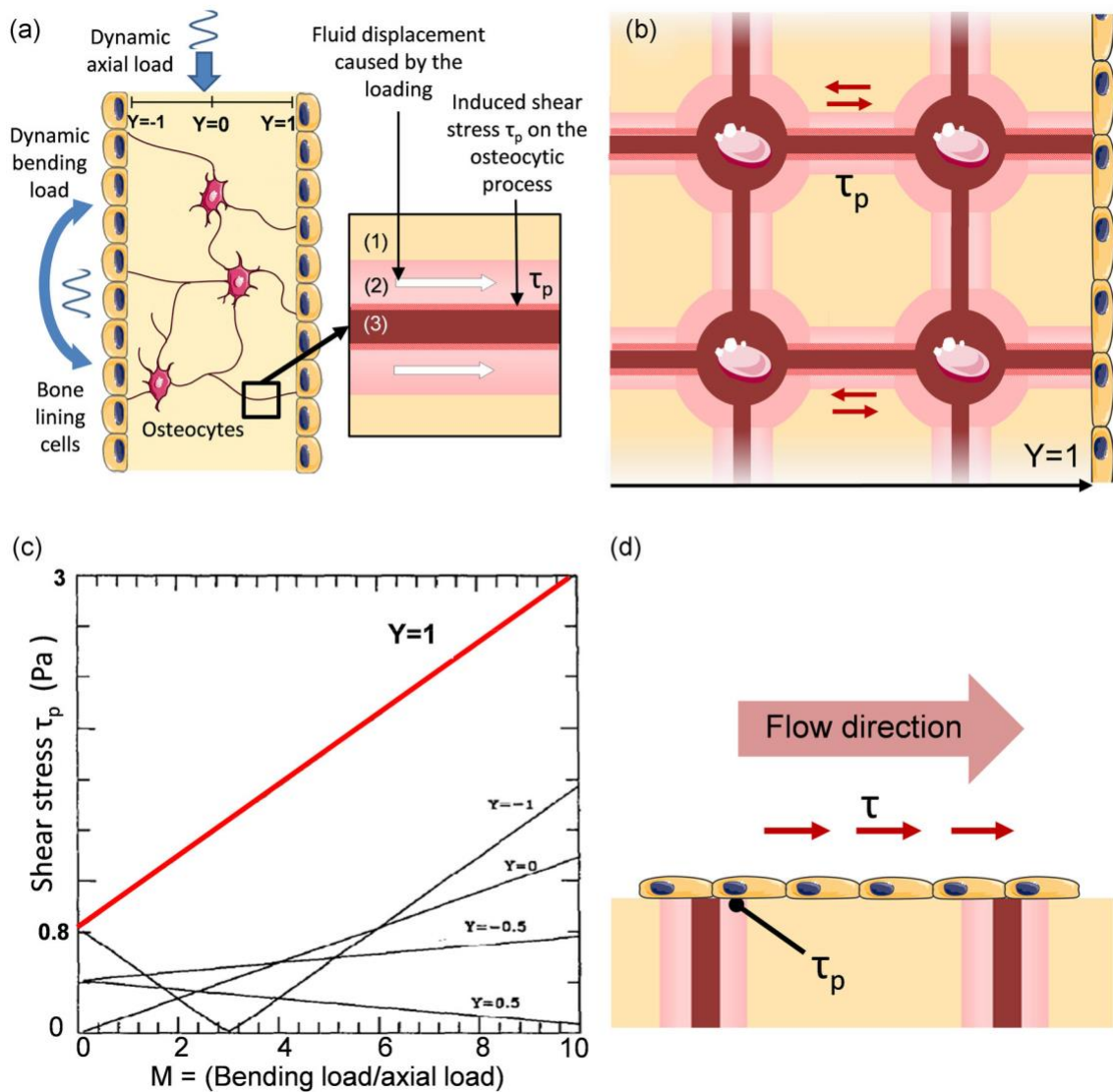


FIGURE 6 Weinbaum lacunar–canalicular porosity model. (a) Diagram showing a simplified trabecular cross-section with bone lining cells and osteocytes submitted to oscillatory axial and bending loads as studied by Weinbaum et al. (1994). The fluid displacement caused by the loading in the periosteocytic space (1) of the canaliculi (2) generates shear stress on osteocytic processes (3). (b) Scheme illustrating the idealized Weinbaum's model of a trabecular cross-section where the shear stress amplitude on the membrane surface of the osteocytic processes τ_p is calculated for different depths Y . (c) Plot of the maximum τ_p as a function of the bending to axial load ratio at different locations Y . The known 0.8–3 Pa range (in red) corresponds to the periodic maxima at $Y=1$ for M ranging between 1 and 10 (from Weinbaum et al., 1994). (d) Difference between τ_p at $Y=1$ and the shear stress τ applied to the cell surfaces

The shear stresses calculated in most perfusion studies correspond to flow-induced shear stress on scaffold walls, which would correspond to the shear stress applied to osteon walls in vivo. Reproducing the theoretical 0.8–3 Pa range in perfusion studies is equivalent to trying to reproduce the physiological shear stress τ_p applied to osteocyte membranes approaching the osteon walls by applying a similar shear stress on scaffold walls (Figure 6d). This configuration neither emulates the in vivo stimulation of bone lining cells (i.e., flat osteoblastic cells covering bone surfaces) nor the mechanical environment encountered by osteocytes in the lacunar–canalicular porosity (Wittkowske et al., 2016). Therefore, there is a priori no scientific incentive to reproduce this range of shear stress in perfusion experiments.

4.1.2 | Two-dimensional systems

Parallel flow chambers were specifically introduced to study shear stress effects. In a rectangular section, wall shear stresses are reliably defined by the following equation:

$$\tau = (6 \times Q \times \mu) / (w \times h^2) \quad (6)$$

with Q being the flow rate, μ being the medium viscosity, w being the width, and h being the height of the flow chamber (Figure 7a).

In these devices, the shear stresses exerted on cells are approximately equal to the chamber wall shear stresses, allowing fine tuning of these parameters. Two-dimensional (2D) plates are a

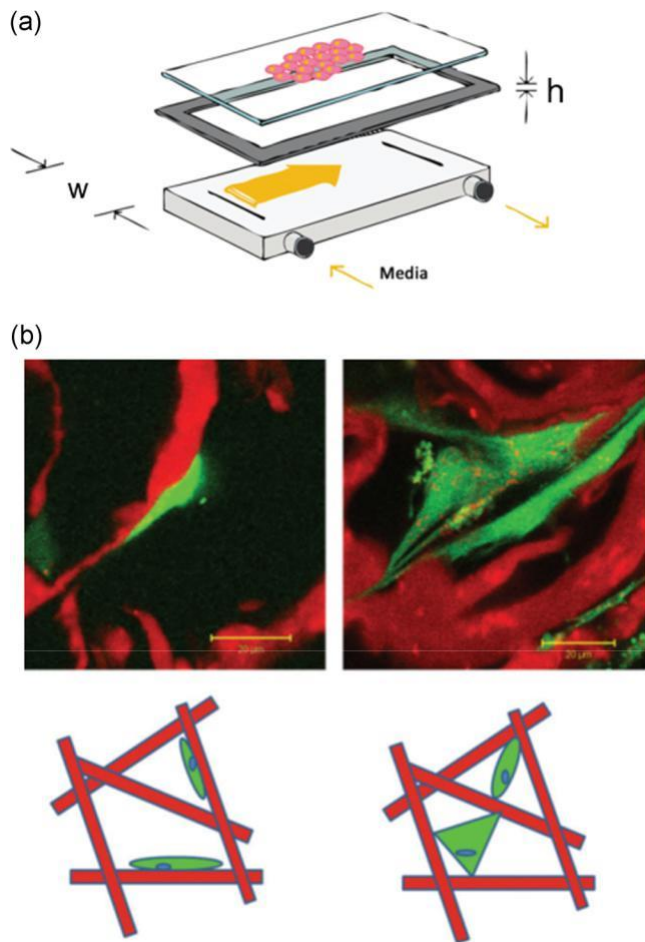


FIGURE 7 Two-dimensional models and consequence on cell attachment. (a) Schematic of a parallel-plate flow chamber (from Cooper et al., 2012) (b) Top: fluorescence microscopy images showing cells attached either predominantly flatly to collagen struts (left) or in a bridged manner (right). Bottom: schematic diagram of attachment morphologies with flatly attached cells on the left and bridged (either dual or multiattachment points) cells on the right. For both microscopy images and schematics, the collagen structure is depicted in red, and the cell cytoplasm is in green (from McCoy and O'Brien, 2010)

powerful tool in mechanotransduction studies as they allow accurate experimental designs built around controlled shear stress values. However, 2D culture conditions do not reproduce the typical environment of bone cells as they are forced to grow in monolayers (Antoni, Burckel, Josset, & Noel, 2015). An artificial flat and rigid surface is a geometrical, mechanical environment that affects the cytoskeleton (e.g., actin patterns) of bone cells and more broadly, their fate (Dalby, Gadegaard, & Oreffo, 2014; Zhou et al., 2017). Consequently, in contrast to 3D setups, 2D configurations notoriously skew bone cell responses to mechanical stimuli (Juignet et al., 2017; McCoy & O'Brien, 2010).

In macroporous scaffolds (3D environment), cells can either be attached flatly to the scaffold surface or bridged between two or more surfaces (Figure 7b; Annaz, Hing, Kayser, Buckland, & Di Silvio, 2004). Bridged cells are expected to experience up to 500 times

greater levels of cytoskeletal deformation at an equal shear (Jungreuthmayer et al., 2009). For this reason, osteogenic shear stress obtained in 2D conditions cannot be used as a reference to predict cell behavior in 3D porous scaffolds.

4.1.3 | Deducing optimal ranges from the literature

Numerous fluid shear stress values have been reported as osteogenic. Values as low as 10^{-4} Pa and up to 2 Pa have yielded positive results in 3D systems (Chen et al., 2016; McCoy & O'Brien, 2010). In the absence of means to compare the osteogenicity of shear stress values in different setups, it is possible that "popular" shear stress ranges merely correspond to protocols commonly found in the literature. Moreover, as most reported studies used static culturing as a control, the effects attributed to shear stress values can result from increased circulation rates. As both shear stress and circulation velocity are tied to flow rate, perfusion studies based on flow rate variation do not permit us to distinguish which cell responses are associated with velocity-regulated chemical cues and which are correlated with the biomechanical cues imparted by proportionally modulated shear stresses.

This problem persists in studies that adequately report both shear stress and circulation velocity ranges. For instance, Grayson et al. (2011) noted the impracticality of using flow rate values as a parameter and instead reported flow velocities, shear stresses, and oxygen concentrations inside decellularized bone scaffolds, providing useful data points. However, controlling velocity by changing the flow rate proportionally altered shear stress values. The observed effects are then tied to the resulting velocity-shear combinations, which are unique to the scaffold used in the experiment and do not provide additional information on the individual effects of shear stress and velocity. A method to circumvent this challenge will be discussed in Section 5—"Future challenges and strategy".

4.2 | Semirandom architectures

Most traditional scaffold manufacturing techniques can create only semirandom architectures, that is, structures with wide distributions of pores and pores interconnections shapes and sizes, commonly associated with significant heterogeneities of the macroporous network.

4.2.1 | Heterogeneity issues

Depending on the properties of these heterogeneities (e.g., disparity with mean value and prevalence), scaffold "average" declared properties (cf. Section 2.2) may no longer correlate with the actual flow effects. Indeed, similar to electrical currents, fluids tend to flow through the paths of least resistance. This resistance corresponds to the ratio between the pressure gap between the inlet and the outlet (i.e., pressure drop P) and the flow rate (Q). In

a pipe of length L and diameter d , the resistance R is given by the following equations:

$$R = \Delta P / Q,$$

$$R = \mu L / 2\pi d^4.$$

For a given pressure drop, the flowrate distribution between two possible pathways of resistance R_1 and R_2 (Figure 8a) is then given by the relationship:

$$Q_1 = R_2 = \left(\frac{d_1}{d_2}\right)^4.$$

$$\overline{Q_2} \quad \overline{R_1} \quad \overline{d_2}$$

As channel diameter ratios are raised to power 4, even small heterogeneities in pore and pore interconnection sizes can cause significant flow redistributions in a scaffold and redefine the local cell environment.

In Maes et al. (2012), 4-mm thick scaffolds manufactured by gel casting have a declared pore size of 270 μm . However, whole scaffold $\mu\text{-CT}$ revealed the presence of macropores spanning upto 1.6 mm, that is, six times the declared 270 μm pore size and 43% of the scaffold total height. The simulated streamlines clearly show that preferential flow pathways are defined by these macropores, while the rest of the scaffold is comparatively undersupplied (Figure 8b). In those conditions, the mechanical environment is not defined by the specified scaffold properties but by the uncontrolled heterogeneities associated with the manufacturing process.

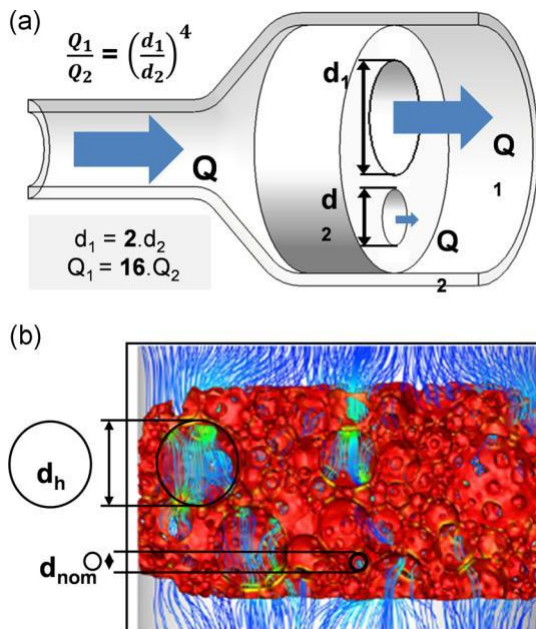


FIGURE 8 Flow rate distribution vs pore size homogeneity. (a) Illustration of the nonproportional flow rate distribution between two channels of different diameters (Equation (9)). (b) Simulated flow streamlines across a gel cast hydroxyapatite scaffold. Although the nominal pore diameter (d_{nom}) is 270 μm , a significant portion of the flow is diverted by a few pores (heterogeneities) with a higher diameter (d_h) (from Maes et al., 2012)

4.2.2 | Distribution issues

The appeal of some irregular structures is in the way they mimic

- (8) the complexity of the physiological environment. However, random and complex structures are ineffective when trying to understand cell responses to specific stimuli. Most current monitoring techniques (e.g., alkaline phosphatase activity, ARN, and bone-specific protein expression) allow only the study of cell populations as a whole, thus averaging out the effects of the local flow ranges found across a scaffold (Voronov, VanGordon, Sikavitsas, & Papavassiliou, 2010). Therefore, scaffolds generating
- (9) broad distributions of shear stress and velocity values make it impossible to identify whether a narrower range of stimuli is responsible for the observed cell response. These distributions depend on the scaffold architectural properties (Boschetti, Raimondi, Migliavacca, & Dubini, 2006); thus, these distributions are unique to each batch of scaffolds or to each scaffold, depending on the reliability of the manufacturing process. In a simulation run by Jungreuthmayer et al. (2009) in a freeze dried collagen-GAG scaffold, the calculated shear stresses were un-evenly scattered across almost two orders of magnitude (0–80 mPa; Jungreuthmayer et al., 2009). In this example, there is no way to know if the observed cell response is due to the cell population submitted to shear stresses in the 5–10 mPa or 40–50 mPa range.

In Liu, Han, Hedrick, Modarres-Sadeghi, and Lynch (2018), computational fluid dynamics (CFD) are adequately used to confirm that distributions of shear stress and fluid velocity remain constant in various subvolumes of salt-leached PLG-HA bone-mimicking scaffolds. Nevertheless, the calculated shear stress values are distributed from 0.01 to 2,200 mPa, and the fluid velocity ranges from 0 to 4,260 $\mu\text{m/s}$.

Furthermore, neither mean nor median values, which are often used to describe mechanical environments, permit the discrimination

of the range of stimuli responsible for a given osteogenic response. In Jungreuthmayer et al., the mean shear stress value of 19 mPa concerns only a small percentage of the cell population (10.4% in the 16–20 mPa range); therefore, it does not provide additional insights into the optimal ranges of shear stress.

4.3 | Goldstein approximation

4.3.1 | Presentation

To estimate fluid circulation velocity and shear stress levels inside the scaffold from the flow rate value and scaffold properties, Goldstein et al. (2001) introduced a simplified scaffold model. In this approximation, the complex scaffold geometry is simplified by reducing the interconnected pore network to a bundle of parallel, cylindrical channels whose diameters are equal to the scaffold average pore size (Figure 9; Grayson et al., 2008). This model allows the direct use of the simple relationships between the setup parameters and resulting flow effects presented in Section 2.1 (cf. Eq. (1) to (5)).

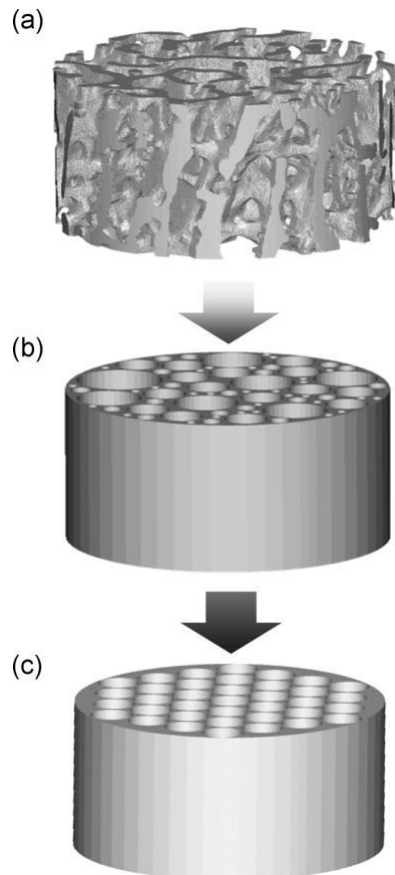


FIGURE 9 Principle of Goldstein approximation. Illustration of the cylindrical channel approximation from Goldstein et al. (2001). (a) represents a cylindrical section of rat trabecular bone. In (b), the pore networks are simplified to cylindrical parallel channels of various diameters, representing the physiological size distribution of the trabecular bone macroporous network. In (c), those channels are considered to have the same diameter, taking the sample average pore size as reference. The flow-induced shear stress in a is estimated by applying Equation (6) $\tau = (8 \cdot \mu \cdot Q) / (d \cdot A \cdot p)$ to (c)

4.3.2 | Usefulness and limitations

In a comprehensive list of 48 perfusion bioreactor-based studies edited from the most cited reviews in the field (Gardel et al., 2014; McCoy & O'Brien, 2010; Yeatts & Fisher, 2011), two-thirds of the studies limited their experiments to comparing static culturing with perfused culturing. In addition, most of the 16 studies that did take shear stresses into account relied on the Goldstein model. Thus, this approximation played a central part in shaping the scientific landscape surrounding perfusion bioreactors and bone mechanotransduction studies.

By introducing and popularizing an easily obtainable shear stress estimation, the Rice University team was among the first and most vocal to note the need to determine effective flow effects across different 3D structures and promoted a sounder methodology by encompassing a range of flow and scaffold-related parameters. However, this approximation offers only an estimation of average flow conditions based on the average theoretical scaffold properties;

therefore, it provides limited insight into the actual mechanical environment of the cells (cf. Section 4.2).

Currently, shear stress values can be predicted through CFD through 3D models computed from scaffolds (Boschetti et al., 2006; Cioffi, Boschetti, Raimondi, & Dubini, 2006; Jungreuthmayer et al., 2009; Maes et al., 2012; McCoy et al., 2012; VanGordon et al., 2011). The steadily increasing computational power and availability of high-end CFD software make these simulations the most reliable tool at our disposal to assess mechanical constraints in complex geometries. By comparing shear stresses predicted by CFD data with corresponding mean shear stress values predicted by the Goldstein approximation, we found that although suitable in some studies (Cioffi et al., 2006; Jungreuthmayer et al., 2009; Maes et al., 2012), the approximation could also generate heavily inaccurate results, as highlighted in Figure 10. The links between the approximation accuracy and the scaffold internal architecture are developed in Section 4.3.3.

4.3.3 | Discrepancies in shear stress predictions and the key role of the macroporous network

The homogeneous porous media flow (HPMF) model, which considers the scaffold as a homogeneous permeable solid, has been

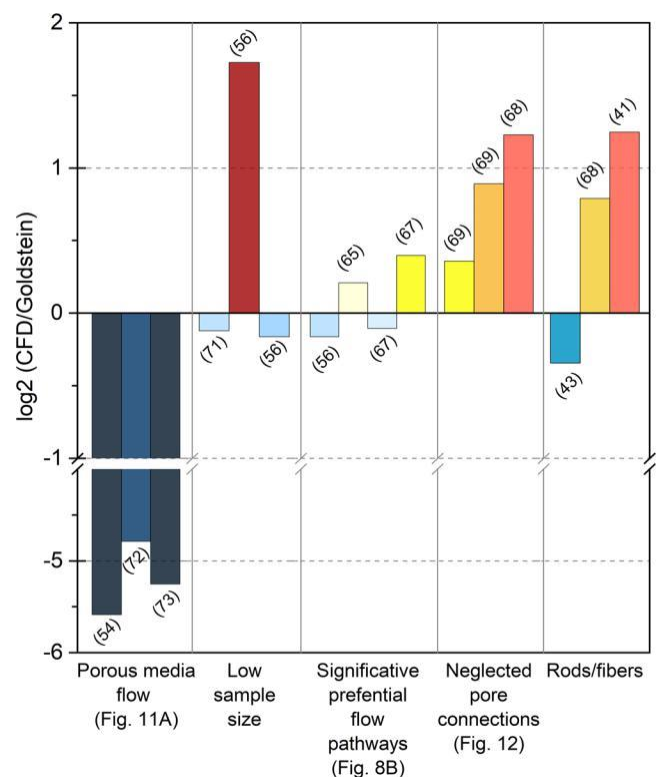


FIGURE 10 Goldstein approximation robustness. Histogram of the log₂ ratio of the computational fluid dynamics (CFD)-generated shear stress values over the average shear stress in the scaffold predicted by the Goldstein approximation. Log₂ values vary between -5.5 and 1.8, indicating that depending on the study, the Goldstein approximation gives shear stress values ranging from 45 times lower (Kleinhaus et al., 2015) to three times higher (McCoy et al., 2012) than those predicted by CFD

used in recent studies (Kleinhans et al., 2015; Vetsch, Betts, Muller, & Hofmann, 2017) to encompass scaffold hydraulic properties (e.g., porosity and permeability) while reducing the complexity of the simulation. Figure 11a shows the shear stress distribution at the median transverse cut plane predicted by this model for a flow rate of 12 mL/min (Vetsch et al., 2017). Figure 11b shows the shear stress distribution in a similar scaffold generated by finite element analysis (FEA) based on the actual scaffold geometry for a lower flow rate of 0.3 mL/min. With similar architectural features, shear stress should be proportionally higher for a 12 mL/min flow rate than for 0.3 mL/min (Equation (5)). However, the shear stress values obtained with the porous media flow model are significantly lower and essentially inconsistent with other FEA studies using actual scaffold geometries in similar flow conditions (Cioffi et al., 2006; Jungreuthmayer et al., 2009; Maes et al., 2012; VanGordon et al., 2011). This effect is confirmed in different studies (Egger et al., 2017; Kleinhans et al., 2015) where the use of the HPMF model also led to significantly lower shear stress values than expected (Figure 10). In addition, this model suppresses valuable information by canceling out local shear stress concentrations within the scaffold and overestimates the radial shear stress gradient at the scaffold border, as shown in Figure 11a. For those reasons, we advise against the use of HPMF models in BTE applications.

Boschetti et al. simulated wall shear stresses for multiple combinations of pore sizes and porosity in a pattern-based 3D model of interconnected spherical macropores, which was inspired by scaffolds fabricated with porogen or salt-leaching methods. The vertical stacking of constant diameter pores generates parallel cylinder-like volumes (Figure 12a), allowing a direct comparison with the Goldstein cylindrical model. Configurations in which pore interconnection diameters are close to the pore sizes are geometrically close to a cylinder and logically show a good degree of correlation with the Goldstein approximation (Figure 10). However, tighter interconnections generate stronger shear stress peaks, which correspondingly increase the average shear stress inside the scaffolds (Figure 12b–d). As pore interconnections are not considered in the cylindrical model, using this approximation to calculate shear stress in particle-leached scaffolds may consistently underestimate the actual average shear stresses in those structures (Boschetti et al., 2006; McCoy et al., 2012; VanGordon et al., 2011).

Studies for which the Goldstein approximation is consistent with the CFD results present distinctive characteristics (Figure 10). In Cioffi et al. (2006), the CFD simulation involves applying the inlet velocity profile to only three isolated pores, which is not representative of the complex flow environment inside heterogeneous scaffolds and neglects the role of pore interconnections. Similarly, in McCoy et al. (2012), the simulation is run on a 360 μm subvolume for an average pore size of 320 μm , limiting its relevance. Moreover, in both Maes et al. (2012) and Jungreuthmayer et al. (2009), presented flow profiles in interconnected macroporous networks show marked preferential pathways diverting flow from the rest of the scaffold and subsequently decreasing the average shear stress to a range consistent with the cylindrical model.

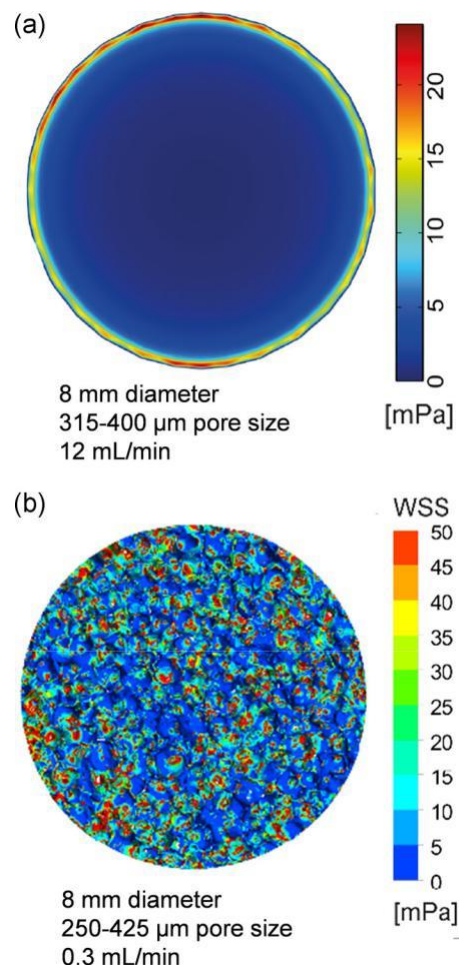


FIGURE 11 Limit of the homogeneous porous media flow (HPMF) model. (a) Wall shear stress map at the transverse cut plane (50%) in an 8-mm diameter salt-leached scaffold (pore size 315–400 μm , porosity 55%) for a 12 mL/min flow rate, calculated with HPMF (from Vetsch et al., 2017). (b) Wall shear stress map at the transverse cut plane (50%) in an 8 mm diameter salt-leached scaffold (pore size 250–425 μm , porosity 80%) for a 0.3 mL/min flow rate, calculated with finite element analysis based on CFD using the actual scaffold geometry (from Liu et al., 2018)

Furthermore, the parameters used in the Goldstein approximation, such as the “pore diameter”, are sometimes difficult to reconcile with scaffold features (cf. Section 2.2.3). In Allori et al., pores are formed by perpendicular rod stacks. Depending on the geometrical parameter used to define pore size, its declared value in the study varies from 105 to 350 μm . Moreover, in the CFD analysis, a 1 mL/min flow rate is applied to a model subvolume, which is not equivalent to 1 mL/min perfusion of the whole scaffolds, thus diminishing the experimental relevance of the shear stress values obtained (Figure 13a). Boschetti et al. present conflicting values of Darcy scale velocity and average velocity inside the scaffold, strongly impacting the correlation with CFD predicted shear stresses depending on the value used (Figure 13b). In addition, depending on the study, different viscosity values are declared for similar culture media, from 0.78 (Bacabac et al., 2005) to 1.45 (Cruel et al., 2015; Liu et al., 2018; Olivares, Marshal, Planell, & Lacroix, 2009; Zhao, Vaughan, &

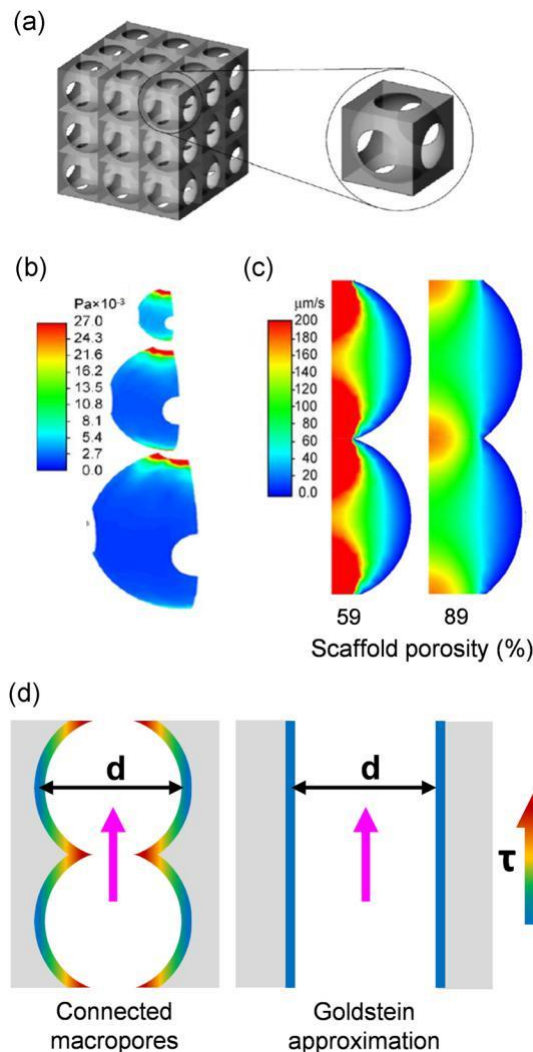


FIGURE 12 Boschetti pore model. (a) Presentation of the geometrical pore model used in Boschetti et al. (2006). (b) Shear stress maps for different pore sizes (50, 100, and 150 μm) showing the maximal shear stress values at the pore interconnections. (c) Fluid velocity maps show that narrower interconnections compared to the pore diameter generate higher speeds at the interconnections. In Boschetti et al., this effect is erroneously associated with the porosity percentage. (d) Comparison of shear stress repartition in interconnected pores and cylindrical channels of the same diameter d , showing why the Goldstein approximation may consistently misestimate shear stress

McNamara, 2016), creating a strong bias in calculated shear stress values for both CFD analysis and the simplified mathematical approach.

As the Goldstein approximation seemed to be the most prevalent source of the seldom declared shear stress values in the literature until a few years ago, the current literature relies on sparse and possibly unreliable data.

4.4 | Other causes of interference in the interpretation of results

In addition to altered flow effects, sources of variability in cell behavior can stem from other scaffold architectural features as well

as the intrinsic chemical properties of the scaffolds and culture media or mechanical stimulation methods. The significant impact of each of these features on *in vitro* bone growth has been well documented, but it seems to be generally overlooked by teams with unrelated specializations.

4.4.1 | Scaffold architectural features and biological response

Beyond altered flow profiles (cf. Section 2), different levels of architecture defined by the manufacturing process significantly affect cell behavior (Li, Wang, Xing, Wang, & Luo, 2016; Marchat & Champion, 2017; Saiz, Zimmermann, Lee, Wegst, & Tomsia, 2013).

Apart from the permeability, mainly controlled by the macroscopic porous network, the size and geometry of macropores and interconnections were also proved to influence cell colonization, tissue growth and osteogenesis, for example, concave surfaces being greater for tissue growth, osteogenesis and microcapillary-like structure self-assembly than convex surfaces (Bianchi et al., 2014; Gariboldi, Butler, Best, & Cameron, 2019; Juignet et al., 2017; Rumpel, Woesz, Dunlop, van Dongen, & Fratzl, 2008).

Surface microtopography and micropores are surface structures on a micron scale that are often mistaken for each other. Surface roughness influences the morphology, attachment, proliferation and differentiation of bone cells *in vitro* (Anselme & Bigerelle, 2005; Sola-Ruiz, Perez-Martinez, Martin-del-Llano, Carda-Batalla, & Labaig-Rueda, 2015; Zhou et al., 2017). *In vitro*, microporosity results in a larger surface area that is believed to contribute to ion exchange as well as higher bone-inducing protein adsorption (Gariboldi & Best, 2015; Hannink & Arts, 2011).

4.4.2 | Influence of the chemical environment on cell responses to mechanical stimuli

Material surface physicochemical properties (e.g., solubility, wettability, hydrogen potential) and culture medium have a defining impact on *in vitro* cell behavior and shear stress responses.

Shear stress responses conditioned by surface chemistry

Cells approaching an implant material do not make direct contact with its surface but interact with a layer of proteins rapidly adsorbed from the culture medium (Anselme, 2000). Because cells depend on specific proteins for anchorage and extracellular cues, the composition and conformation of adsorbed proteins at the material surface are key mediators of cell behavior (Bouet, Marchat, et al., 2015; Fourel et al., 2016; Streuli, 2009; Wilson, Clegg, Leavesley, & Pearcy, 2005). Material intrinsic properties and particularly surface properties (e.g., surface chemical functional groups) affect the key early event of protein adsorption and subsequent cell adhesion, growth, and differentiation (Anselme, Ponche, & Bigerelle, 2010; Bouet, Marchat, et al., 2015; Vitte, Benoliel, Pierres, & Bongrand, 2004), as well as their response to shear stress (Li, Luo, Huang, et al., 2013; Li, Luo, Xie, et al., 2013; Li et al., 2016). Regarding shear stress

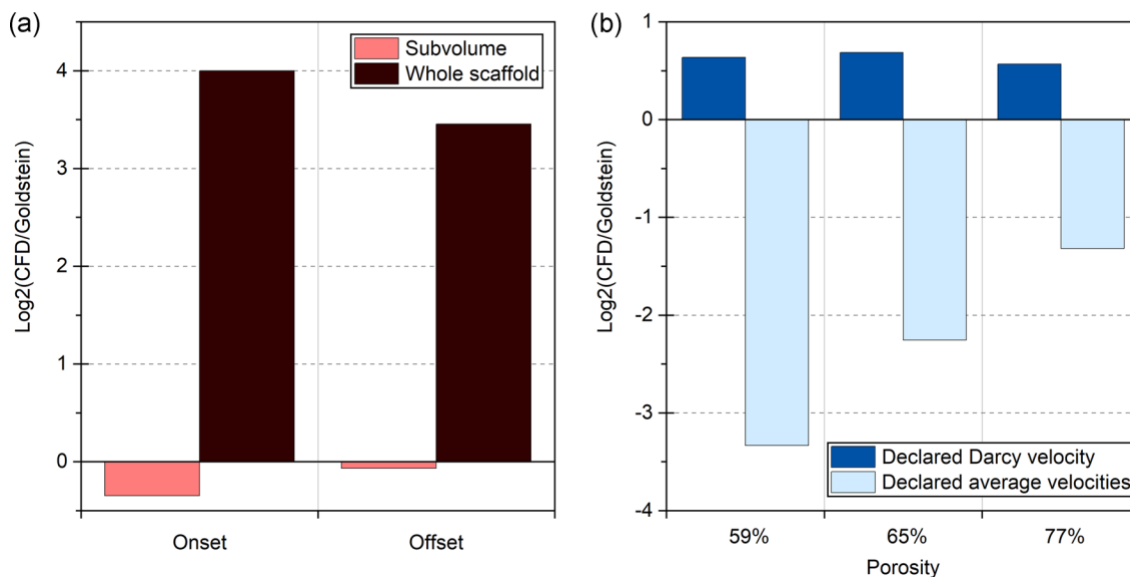


FIGURE 13 Significance of the reported data. (a) Differences between Goldstein and CFD predictions for shear stress (expressed as $\log_2[\text{CFD}/\text{Goldstein}]$) in offset and onset robocasted scaffolds for a 1 ml/min flow rate (Allori et al., 2016). In the CFD simulation, this 1 ml/min flow rate is applied to a scaffold subvolume, while it is applied to a whole scaffold in the actual bioreactor. (b) Differences between Goldstein and CFD predictions for shear stress (expressed as $\log_2[\text{CFD}/\text{Goldstein}]$) in scaffolds with different porosities and macroporous features. Using the declared average velocities instead of the Darcy scale velocity leads to strong discrepancies. CFD, computational fluid dynamics

responses, Li et al. (2016) demonstrated in 2D systems that the chemical functionalization of glass slides with terminal -OH, -CH₃, and -NH₂ groups regulates primary rat osteoblast responses to fluid shear stress.

Influence of medium composition

Culture medium ionic environment, pH value, and especially osteogenic supplementation such as dexamethasone, β -glycerophosphate, and ascorbic acid have been shown to have a significant impact on cell proliferation, differentiation, and overall bone development (Brunner et al., 2010; Monfoulet et al., 2014; Nishimura et al., 2015; Vetsch, Paulsen, Muller, & Hofmann, 2015), but also on cells response to a dynamic perfusion environment. In the presence of osteogenic supplementation human mesenchymal stem cells subjected to shear stress demonstrated significantly stronger increases in growth and alkaline phosphatase activity (Farack et al., 2011). Fetal bovine serum (FBS), another standard supplement of cell culture media, leads to significant differences in experimental outcomes and have in some instances been shown to cause spontaneous mineralization in silk-fibroin scaffolds, even without cells present (Vetsch, Paulsen, et al., 2015).

Furthermore, FBS-associated RNA is coisolated with cell culture-derived extracellular RNA and interferes with the downstream RNA analysis. FBS transcripts can also be taken up by cultured cells and affect the results of gene expression profiling technologies (Wei, Batagov, Carter, & Krichevsky, 2016). In secretome profiling, proteins contained in the FBS often mask the proteins secreted by cells, concealing their identification by mass spectrometry (Nonnis et al., 2016). Ill-defined medium supplementation and recurrent variability

in serum batch composition (Brunner et al., 2010) introduce several unknown variables into the cell culture system and might be a major reason why different laboratories are unable to reproduce data published in the literature (Vetsch, Paulsen, et al., 2015).

Additionally, most biological in vitro assays are performed under an atmospheric oxygen concentration ($pO_2 = 20\%–21\%$). However, the native environment of bone stem cells contains much less oxygen (e.g., between 1.3% and 4.2%; Spencer et al., 2014). This “in situ normoxia” (Ivanovic, 2009) was proven to be beneficial for most MSC characteristics, improving growth kinetics, genetic stability, and the expression of molecules by MSCs (Bahsoun, Coopman, Forsyth, & Akam, 2018; Haque, Rahman, Abu Kasim, & Alabsi, 2013; Kwon et al., 2017). As such, the current methodology in bone culture exposes bone cells to nonphysiological and widely hyperoxic environments, resulting in chemical stress and loss of function among cultured cells and highlighting the need to improve the current in vitro culture design (Bahsoun et al., 2018; Hu et al., 2018).

4.4.3 | Influence of mechanical stimulus regimen on cell responses

Although most of the above-mentioned studies used a constant perfusion rate, osteocytes are sensitive to various forms of stimuli in vitro, such as oscillating fluid flow (OFF) stimulation (Batra et al., 2005; Coughlin & Niebur, 2012; Dumas et al., 2009; Kavlock & Goldstein, 2011; Li, Rose, Frances, Sun, & You, 2012; Rauh et al., 2011). Li et al. (2012) undertook a systematic characterization of different OFF parameters on osteocyte activity. The results from this study suggest especially that (a) osteocytes exhibit distinctly

different responses to each of the following independent OFF parameters: peak shear stress amplitude, oscillating frequency, and stimulation duration; (b) different mechanotransduction mechanisms likely exist for regulating osteocyte COX-2 and RANKL/OPG messenger RNA expression; and (c) the effects of each OFF parameter appear to work together in a cumulative manner in regulating osteocyte activity. The introduction of multiple additional parameters (e.g., frequency, amplitude) makes the results provided by these studies more difficult to compare or interpret.

The defining impact of such parameters might raise questions about the widespread use of peristaltic pumps. The characteristics of the pulsatile flow generated by this type of equipment depend on the model and may introduce yet another source of interstudy variability.

Another popular stimulation methodology is to submit cells to the dual effect of perfusion and cyclic mechanical loading of the scaffold; submitting cells to both flow-induced shear stresses and substrate deformation is an attempt to better reproduce *in vivo* stimuli (Bouet, Cruel, et al., 2015; David et al., 2008; Dumas et al., 2009; Stops, Heraty, Browne, O'Brien, & McHugh, 2010; Zongming et al., 2013). Nonetheless, to our best knowledge, fluid movement due to substrate deformation has never been quantified, making the resulting cell responses much more arduous to interpret as the flow patterns remain unknown.

5 | FUTURE CHALLENGES AND STRATEGY

5.1 | Defining culture standards

As previously explained, the most common approach since the introduction of 3D perfusion bioreactors has simply been to test combinations of cells and scaffolds and link the observed biological effects to the corresponding flow rate value. Unfortunately, the conclusions of these studies are nongeneralizable as they cannot be related to fluid circulation speed and shear stress values, which are two key factors independently affecting bone cell behaviors and tissue development. Therefore, the first challenging target in the 3D controlled culture system is the determination of the ranges of both shear stress and mass transport values responsible for cell survival and osteogenic stimulation, as outlined in Figure 5c. This challenge can be overcome by the purposeful design of shear stress distribution within the scaffolds at a given velocity. Specifically, narrowing the ranges of both parameters to a homogeneous mechanical environment would allow their direct association with the observed biological response. How a given flow rate will translate into this combination of fluid circulation speed (determining nutrient transport, waste management and paracrine communication mechanisms) and shear stress depends on the bioreactor design and scaffold properties.

5.1.1 | System design

In addition to a relevant stimuli regimen, a necessary condition for controlling the scaffold mechanical environment through the flow rate is to ensure that all the medium is actually flowing through

the scaffold. The scaffolds could be press-fitted into custom designed sealing systems to ensure proper perfusion and prevent undesired flow pathways (Du et al., 2015). Leaks can be reduced by adjusting the fluidic circuit to decrease hydrostatic pressure build-ups and ensuring that components do not deteriorate over the culture duration (Allori et al., 2016). Homogeneous perfusion also requires a homogeneous flow pattern to expose the whole scaffold surface to equivalent flowing conditions. Thus, the bioreactor chamber must be designed in accordance with its expected operating flow rate range to ensure adapted velocity fields throughout the scaffolds. Moreover, depending on the flow conditions, ill-designed chambers can generate swirls. Swirls can lead to disruptive flow patterns and may lead to medium stagnation, compromising the culture (Freitas, Almeida, & Bartolo, 2014; Vetsch, Hofmann, & Müller, 2015). Therefore, in the development phase, computational simulation of the velocity fields must be performed on the full bioreactor chamber volume to define its suitable design with respect to the expected operating flow parameters and scaffold properties.

5.1.2 | Scaffold properties

Scaffold architectural features and the ability to accurately control them play a central role in achieving an exploitable mechanical environment (Choi, Zhang, & Xia, 2010). We find essential to note that randomness often seems to be mistaken for homogeneity (Liu et al., 2018; Maes et al., 2012; Qian, Yuan, Zhimin, & Anchun, 2013). Conventional scaffold manufacturing methods (e.g., particle leaching and fiber meshing) can create only structures with high variability in shape and size within their macroporous network, resulting in "uniformly dispersed" shear stresses and fluid velocities within the scaffolds at best (Liu et al., 2018).

New engineering developments combining computational methods and additive manufacturing (AM) technologies allow for interscaffold repeatability and predictable flow distributions but do not provide a homogeneous mechanical environment unless the scaffolds are designed for this purpose. For instance, in robocasted scaffolds (Figure 4d,f), rods are typically arranged across the flow, exposing different portions of the rods to significantly different shear stress values (Allori et al., 2016; Sonnaert et al., 2017). Moreover, most of the time, flow simulations in AM scaffolds are run with the original 3D model (Allori et al., 2016; Guyot et al., 2014; Sonnaert et al., 2017), neglecting that 3D-printed scaffolds can display significant intersample variability and deviation from their original design (Marin & Lacroix, 2015).

For generating ranges narrow enough to discriminate the values of shear stress and fluid velocity to which a given cell type is most responsive, an accessible design would comprise cylindrical channels of equivalent diameters arranged alongside the flow direction, actually generating the ideal environment assumed in the Goldstein approximation. The large class of periodic minimal surfaces is also particularly interesting for these *in vitro* applications. Indeed, triply periodic minimal surfaces ensure a regular macroporous network and can be extensively manipulated, allowing for easier design of shear stress distributions. Moreover, the permeability of these structures is more than tenfold

greater than that within a scaffold with random-pore architecture of comparable porosity and pore size (Melchels et al., 2010).

5.1.3 | Disentangling flow effects

As shear stress is proportional to both fluid velocity and viscosity, we can use these parameters to separate the effects of mass transport and shear stress on tissue growth. Increasing the medium viscosity by adding dextran, which does not seem to have an impact on hBMSC cultures at low concentrations (Li, Dai, & Tang, 2008), exposes cultured cells to increased levels of fluid shear stress while maintaining essentially constant chemotransport conditions for nutrient delivery and waste removal. Flow rate and viscosity can also be modified simultaneously to expose cells to various speeds of circulation while maintaining constant shear stress. This strategy established that shear stress and mass transport levels are independent biological stimuli (Li et al., 2009; Sikavitsas, Bancroft, Holtorf, Jansen, & Mikos, 2003). The systematic application of this approach in scaffolds generating narrow and predictable ranges of shear stress and velocity would allow the determination of the optimal fluidic environment for bone growth and more generally, a better understanding of the effects of culture conditions on a given cell type in 3D perfused systems. Since not all cells react in the same way to chemical and mechanical stimuli, it is essential to validate the parameters of the system with the cell type(s) (Bouet, Marchat, et al., 2015) most adapted to the scientific question or intended application. As a key component of the 3D culture system, the cells used have to be thoroughly sorted and selected, for instance with antibodies targeting cell-specific surface markers (Camilleri et al., 2016; Zhang et al., 2019).

5.2 | Perspective

The next challenge is the large-scale implementation of standardized 3D perfused systems, leading to operative platforms for fundamental research or clinical and biomedical applications (Junaid, Mashaghi, Hankemeier, & Vulto, 2017; Piroso, Gottardi, Alexander, & Tuan, 2018; Tandon, Marolt, Cimetta, & Vunjak-Novakovic, 2013). These operative platforms will pave the way for a new paradigm for the current procedures of biological testing or the founding principles of preclinical research by achieving significant time, human resource and cost savings over conventional testing as well as the setup of assessment procedures closer to human physiology than animal models.

5.2.1 | Live-monitoring cell behavior

Current monitoring strategies are based on histology, immunohistochemistry, and protein quantification (e.g., enzyme-linked immunosorbent assay, Western blot analysis, polymerase chain reaction methods). The current state of these technologies provides detailed imaging of various cell mechanisms and high sensitivity to molecules of interest (Kieninger, Weltin, Flamm, & Urban, 2018). However, in addition to being highly time consuming, these techniques are either

costly or destructive, greatly limiting the number of data points obtainable in a study.

Nondestructive live-monitoring techniques (e.g., microscopy, microsensors) would shrink the time associated with traditional monitoring techniques, suppress limitations regarding the number of data points, and greatly reduce the number of scaffolds necessary to obtain statistically significant results over multiple time points. Microsensor systems are already in use regarding culture stable constants, such as O₂, pH, glucose, and lactate (Kieninger et al., 2018; Zhang et al., 2017). Live-monitoring of specific cell activity markers would provide unique insights into cellular interactions within a dynamic mechanical and chemical environment (Kieninger et al., 2018), such as osteoblast, osteocyte, osteoclast, or adipocyte markers (e.g., alkaline phosphatase, osteocalcin, sclerostin, Trap5b, adiponectin, and FABP4; Daniele et al., 2018; Han, Ju, & Geng, 2018; Wedrychowicz, Sztéfko, & Starzyk, 2018; Zhu et al., 2018). Among other approaches, organic electrochemical transistor (OECT) technology appears to be a strong candidate for this application (Inal et al., 2017; Khodagholy et al., 2013; Rivnay et al., 2013; Rivnay et al., 2018). Further information about OECTs can be found in Rivnay et al. (2018).

5.2.2 | Automation

Reasonably, automation has been repeatedly proposed as a solution for standardization and cost reduction (Martin, Smith, & Wendt, 2009; Martin, Wendt, & Heberer, 2004; Nerem, 2014; Salter et al., 2012; Tandon et al., 2013; Yeatts & Fisher, 2011). However, until recently, process automation was associated with high upfront cost and required specific sets of skills to implement. Currently, the increased availability of programmable commercial modular solutions dedicated to fluidics (e.g., Elvexys®, Fluigent®, Cellix®) and accessible microcontrollers (e.g., Arduino®, BeagleBone®, RaspberryPi®) associated with generic fluidics components (e.g., electro-valves, switches, manifolds) paves the way in every laboratory for easier automation of tasks, such as medium sampling and renewal, or even critical steps such as scaffold cell seeding. Many cell seeding protocols do not grant a homogeneous cell distribution, and involve time-consuming procedures and technical handling of the seeded scaffold which places unnecessary stress on cells and increases contamination risks. In contrast, automated bioreactor systems can deliver safe and standardized production of engineered tissue constructs, maximizing prospective scale-up and cost-effectiveness in the long term (Martin et al., 2009).

5.2.3 | Managing culture evolution

In continuous perfusion studies, the flow rate remains constant for the duration of the experiment. However, as bone growth progresses, the construct initial porosity decreases, and pores either decrease in size or become completely obstructed, modifying the mechanical environment to which cells are exposed over time (cf. Section 2). Considering a constant flow rate into a cylindrical channel of initial diameter d_0 constricted into a

channel of diameter d_t after a period (t) of ECM deposition, the resulting circulation velocity v_t and shear stress at the ECM surface τ_t in this very simplified model are given by the following equations, obtained by developing Equations (1) and (5) with a constant Q :

$$v_t = \frac{d_0^2}{d_t^2} \times v_0 \quad \text{and} \quad \tau_t = \frac{d_0^3}{d_t^3} \times \tau_0 \quad (10)$$

In experiments involving significant tissue growth in regard to the scaffold's available space, fixing the flow rate systematically initiates an accelerating increase in fluid velocity and shear stress, potentially offering a partial explanation for why many bone cell populations seem to die down after a few days or weeks *in vitro*. Although working with a constant perfusion flow rate is the most popular methodology, pumps with integrated pressure control can provide a constant pressure drop. In the simplified model described above, the relations between the evolving fluid velocity, shear stress, and the initial conditions in this configuration are then given by the following equations, obtained by developing Equations (5) and (8) with a constant P :

$$v_t = \frac{d^2}{d_0^2} \times v_0 \quad \text{and} \quad \tau_t = \frac{d^3}{d_0^3} \times \tau_0 \quad (11)$$

This configuration better emulates *in vivo* conditions where fluid displacements are dictated by pressure differences between more compressed areas and the rest of the bone volume.

Moreover, these models approximate the ECM surface to a moving solid boundary, whereas interstitial flow within the ECM is a key element intervening in the osteocytic differentiation of embedded cells. Compared to the flow-induced shear stress at the surface of the ECM, interstitial flow within the ECM generates significantly higher levels of shear stress for embedded cells (Guyot, 2015), which are also more likely to be in a bridged configuration (Figure 7b). In addition, to shear stress, bridged cells are also submitted to drag forces (You et al., 2004), which entail greater levels of deformation. Thus, surface shear stress decreasing proportionally to ECM growth (Equation 11) offers an interesting configuration that should be investigated.

Combined with live cell monitoring and automation, numerical bone growth models (Guyot, 2015), integrating the deposition of ECM and its impact on the macroporous network and resulting flow environment, will help to adjust and maintain optimal flow parameters throughout the culture.

5.2.4 | From single culture to multiorgan models

Bone homeostasis, especially bone remodeling, is regulated by crosstalk between (a) bone cells, (b) bone cells and cells of other lineages, and (c) bone and other vital organs (Florescu-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simoes, & Cerri, 2015; Zaidi, Yuen, Sun, & Rosen, 2018). The most minimal *in vitro* models of bone remodeling fundamentally require the coculture of osteoblasts and osteoclasts

osteoblasts, osteoclasts and sometimes osteocytes, predominantly in conventional 2D (138) or static 3D (e.g., gels; Vazquez et al., 2014), have provided valuable data on osteoblast-osteoclast interactions and emphasized the role of osteocytes as sensors and orchestrators of the function of both osteoblasts and osteoclasts (Bouet, Cruel, et al., 2015; Florescu-Silva et al., 2015; Owen & Reilly, 2018; Zhu et al., 2018).

Physiologically relevant, controlled, dynamic 3D coculture models (Beskardes, Hayden, Glettig, Kaplan, & Gumusderelioglu, 2017; Papadimitropoulos et al., 2011; Piroso et al., 2018) will be able to recapitulate "facets of *in vivo* organ function", as described by Edington et al. (2018). Furthermore, the physiological combination of different healthy or pathologic tissue models by means of microfluidic platforms could recreate, at least partly, the systemic cues that mediate interorgan/tissue crosstalk. Uncovering molecular communications between a bone tissue model and other organs or tissues, such as muscle (Brotto & Bonewald, 2015; Karsenty & Mera, 2018; Maurel, Jahn, & Lara-Castillo, 2017), pancreas (Faienza et al., 2015; Shirakawa, De Jesus, & Kulkarni, 2017), liver (Collier, 2007), kidney (Vervloet et al., 2014), intestine (Keller & Schinke, 2013), stomach (McCabe & Parameswaran, 2017), thyroid and adrenal glands (Rockville, 2004), and lymphoid tissue (Sato et al., 2013), could contribute to a better understanding of the endocrine functions of human bone tissue (Zaidi et al., 2018), bone remodeling, and associated diseases (Maurel et al., 2017; Owen & Reilly, 2018). These combinations of tissue models could also be used as operative platforms for the evaluation of the efficacy, safety, and toxicity of drug candidates (Edington et al., 2018; Ishida, 2018; Kimura, Sakai, & Fujii, 2018; Tetsuka, Ohbuchi, & Tabata, 2017) and medical devices (Guan et al., 2017), potentially boosting research time and cost efficiency while coming into the scope of the 3Rs principles (replace, reduce, and refine). Although the opportunities offered by these models are game-changing, published proof-of-concept studies and prototypes have yet to switch from technology research to actual biological, clinical, and biomedical applications (Junaid et al., 2017; Kimura et al., 2018).

6 | CONCLUSION

The osteogenic effects of perfusion flow have been discussed for two decades, with the aim of delivering proper guidelines regarding the adequate parameters for bone tissue growth in 3D perfused systems. In this review, we identified multiple factors contributing to this limitation.

A given flow rate breaks down into different shear stress and circulation velocity levels depending on the scaffold features, independently defining the mechanical and chemical cellular environments. Thus, determining generalizable osteogenic culture conditions will require a shift in focus from determining the optimal flow rate in a given setup to defining the optimal combination of shear stress and circulation velocity for a given cell type. A tighter control

(Owen & Reilly, 2018). Existing coculture models combining over the cell environment can be achieved through replacing

commonly used approximations by more rigorous culture and scaffold design including flow simulations ahead the system implementation. When possible, implementing automation will ensure higher degrees of repeatability, lighten the culture workload, and provide exciting perspectives when combined with live monitoring of cell activity.

Achieving control over the cell environment and resulting translatability will provide a solid basis for deepening our understanding of the relations between various culture parameters and biological responses in BTE. Eventually, the understanding of these relations will steer the development of new approaches to bone diseases, replacement, and interactions with other organs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Luc Malaval, Marie- H el ene Lafarge- Proust, Donata Landolo, and Laurence Vico for their valuable input.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

ORCID

Mikhael Hadida  <http://orcid.org/0000-0002-8976-3981>

David Marchat  <http://orcid.org/0000-0002-3052-0029>

REFERENCES

- Allori, A. C., Davidson, E., Reformat, D. D., Sailon, A., Freeman, J., Vaughan, A., ... Warren, S. M. (2016). Design and validation of a dynamic cell- culture system for bone biology research and exogenous tissue- engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(10), E327–E336.
- Allori, A. C., Sailon, A. M., Clark, E., Cretiu- Vasiliu, C., Smay, J., Riccio, J. L., & Warren, S. M. (2008). Dynamic cell culture prevents core necrosis and creates meaningful osteoblastic networks in thick 3D tissue- engineered constructs. *Tissue Engineering. Part A*, 14(5), 840–841.
- Annaz, B., Hing, K. A., Kayser, M., Buckland, T., & Di Silvio, L. (2004). Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: A scanning electron microscopy study. *Journal of Microscopy*, 215(Pt 1), 100–10.
- Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7), 667–681.
- Anselme, K., & Biggerelle, M. (2005). Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long- term adhesion. *Acta Biomaterialia*, 1(2), 211–222.
- Anselme, K., Ponche, A., & Biggerelle, M. (2010). Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H- Journal of Engineering in Medicine*, 224(12), 1487–1507.
- Antoni, D., Burckel, H., Jossset, E., & Noel, G. (2015). Three- dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5517–5527.
- Ashworth, J. C., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2014). Quantitative architectural description of tissue engineering scaffolds. *Materials Technology*, 29(5), 281–295.
- Baas, E., Kuiper, J. H., Yang, Y., Wood, M. A., & El Haj, A. J. (2010). In vitro bone growth responds to local mechanical strain in three- dimensional polymer scaffolds. *Journal of Biomechanics*, 43(4), 733–9.
- Bacabac, R. G., Smit, T. H., Cowin, S. C., Van Loon, J. J., Nieuwstadt, F. T., Heethaar, R., & Klein- Nulend, J. (2005). Dynamic shear stress in parallel- plate flow chambers. *Journal of Biomechanics*, 38(1), 159–167.
- Bahsoun, S., Coopman, K., Forsyth, N. R., & Akam, E. C. (2018). The role of dissolved oxygen levels on human mesenchymal stem cell culture success, regulatory compliance, and therapeutic potential. *Stem Cells and Development*, 27(19), 1303–1321.
- Bancroft, G. N., Sikavitsas, V. I., & Mikos, A. G. (2003). Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue- engineering applications. *Tissue Engineering*, 9(3), 549–554.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 12600–12605.
- Bartnikowski, M., Klein, T. J., Melchels, F. P. W., & Woodruff, M. A. (2014). Effects of scaffold architecture on mechanical characteristics and osteoblast response to static and perfusion bioreactor cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(7), 1440–1451.
- Batra, N. N., Li, Y. J., Yellowley, C. E., You, L. D., Malone, A. M., Kim, C. H., & Jacobs, C. R. (2005). Effects of short- term recovery periods on fluid- induced signaling in osteoblastic cells. *Journal of Biomechanics*, 38(9), 1909–1917.
- Beskardes, I. G., Hayden, R. S., Glettig, D. L., Kaplan, D. L., & Gumusderelioglu, M. (2017). Bone tissue engineering with scaffold- supported perfusion cocultures of human stem cell- derived osteoblasts and cell line- derived osteoclasts. *Process Biochemistry*, 59, 303–311.
- Bianchi, M., Edreira, E. R. U., Wolke, J. G. C., Birgani, Z. T., Habibovic, P., Jansen, J. A., ... van den Beucken, J. J. P. (2014). Substrate geometry directs the in vitro mineralization of calcium phosphate ceramics. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 661–669.
- Bohner, M., Loosli, Y., Baroud, G., & Lacroix, D. (2011). Commentary: Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 478–484.
- Boschetti, F., Raimondi, M. T., Migliavacca, F., & Dubini, G. (2006). Prediction of the micro- fluid dynamic environment imposed to three- dimensional engineered cell systems in bioreactors. *Journal of Biomechanics*, 39(3), 418–425.
- Bouet, G., Cruel, M., Laurent, C., Vico, L., Malaval, L., & Marchat, D. (2015). Validation of an in vitro 3D bone culture model with perfused and mechanically stressed ceramic scaffold. *European Cells & Materials*, 29, 250–267.
- Bouet, G., Marchat, D., Cruel, M., Malaval, L., & Vico, L. (2015). In vitro three- dimensional bone tissue models: From cells to controlled and dynamic environment. *Tissue Engineering Part B- Reviews*, 21(1), 133–156.
- Brotto, M., & Bonewald, L. (2015). Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. *Bone*, 80, 109–114.
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schoffl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). Serum- free cell culture: The serum- free media interactive online database. *Altex—Alternatives to Animal Experimentation*, 27(1), 53–62.
- Camilleri, E. T., Gustafson, M. P., Dudakovic, A., Riester, S. M., Garces, C. G., Paradise, C. R., ... van Wijnen, A. J. (2016). Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical- grade adipose- derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice- compliant production. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 107.
- Cartmell, S. H., Porter, B. D., Garcia, A. J., & Goldberg, R. E. (2003). Effects of medium perfusion rate on cell- seeded three- dimensional bone constructs in vitro. *Tissue Engineering*, 9(6), 1197–1203.

- Chen, L., Song, W., Markel, D. C., Shi, T., Muzik, O., Matthew, H., & Ren, W. P. (2016). Flow perfusion culture of MC3T3-E1 osteogenic cells on gradient calcium polyphosphate scaffolds with different pore sizes. *Journal of Biomaterials Applications*, 30(7), 908–918.
- Choi, S. W., Zhang, Y., & Xia, Y. N. (2010). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering: The importance of uniformity in pore size and structure. *Langmuir*, 26(24), 19001–19006.
- Cioffi, M., Boschetti, F., Raimondi, M. T., & Dubini, G. (2006). Modeling evaluation of the fluid-dynamic microenvironment in tissue-engineered constructs: A micro-CT based model. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(3), 500–510.
- Collier, J. (2007). Bone disorders in chronic liver disease. *Hepatology*, 46(4), 1271–1278.
- Cooper, S., Dick, M., Emmott, A., Jonak, P., Rouleau, L., & Leask, R. L. (2012). In Vitro Leukocyte Adhesion in Endothelial Tissue Culture Models Under Flow. In Dhanjoo, N. Ghista (Ed.), *Biomedical Science, Engineering and Technology*, (Prof. Dhanjoo N. Ghista, pp. 191–208). Shanghai, China: Intech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-science-engineering-and-technology/in-vitro-leukocyte-adhesion-in-endothelial-tissue-culture-models-under-flow>. ISBN: 978-953-307-471-9.
- Coughlin, T. R., & Niebur, G. L. (2012). Fluid shear stress in trabecular bone marrow due to low-magnitude high-frequency vibration. *Journal of Biomechanics*, 45(13), 2222–2229.
- Cruel, M., Bensedhoum, M., Nougier-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 Engineering Part C- Methods*, 21(9), 863–871.
- Dalby, M. J., Gadegaard, N., & Oreffo, R. O. C. (2014). Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature Materials*, 13(6), 558–569.
- Daniele, G., Winnier, D., Mari, A., Bruder, J., Fourcaudot, M., Pengou, Z., ... Folli, F. (2018). The potential role of the osteopontin-osteocalcin-osteoprotegerin triad in the pathogenesis of prediabetes in humans. *Acta Diabetologica*, 55(2), 139–148.
- David, V., Guignandon, A., Martin, A., Malaval, L., Lafage-Proust, M. H., Rattner, A., ... Vico, L. (2008). Ex vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Engineering. Part A*, 14(1), 117–126.
- Du, D., Ushida, T., & Furukawa, K. S. (2015). Influence of cassette design on three-dimensional perfusion culture of artificial bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials*, 103(1), 84–91.
- Dumas, V., Perrier, A., Malaval, L., Laroche, N., Guignandon, A., Vico, L., & Rattner, A. (2009). The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. *Biomaterials*, 30(19), 3279–3288.
- Edington, C. D., Chen, W. L. K., Geishecker, E., Kassisi, T., Soenksen, L. R., Bhushan, B. M., ... Griffith, L. G. (2018). Interconnected microphysiological systems for quantitative biology and pharmacology studies. *Scientific Reports*, 8(1), 4530.
- Egger, D., Fischer, M., Clementi, A., Ribitsch, V., Hansmann, J., & Kasper, C. (2017). Development and characterization of a parallelizable perfusion bioreactor for 3D cell culture. *Bioengineering*, 4(2), E51.
- el Haj, A. J., Minter, S. L., Rawlinson, S. C., Suswillo, R., & Lanyon, L. E. (1990). Cellular responses to mechanical loading in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(9), 923–932.
- Faienza, M. F., Luce, V., Ventura, A., Colaianni, G., Colucci, S., Cavallo, L., ... Brunetti, G. (2015). Skeleton and glucose metabolism: A bone-pancreas loop. *International Journal of Endocrinology*, 758148.
- Farack, J., Wolf-Brandstetter, C., Glorius, S., Nies, B., Standke, G., Quadbeck, P., ... Schamweber, D. (2011). The effect of perfusion culture on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells on biocorrosible bone replacement material. *Materials Science and Engineering B- Advanced Functional Solid-State Materials*, 176(20), 1767–1772.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D., Sasso-Cerri, E., Simoes, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 421746.
- Fourel, L., Valat, A., Faurobert, E., Guillot, R., Bourrin-Reynard, I., Ren, K., ... Albigez-Rizo, C. (2016). β 3 integrin-mediated spreading induced by matrix-bound BMP-2 controls Smad signaling in a stiffness-independent manner. *Journal of Cell Biology*, 212(6), 693–706.
- Freitas, D., Almeida, H. A., & Bartolo, P. J. 2014. Perfusion bioreactor fluid flow optimization. In: Varajao J, Cunha M, Bjorn Andersen N, Turner R, Wijesekera D, Martinho R, Rijo R, editors. *Centeris 2014—Conference on Enterprise Information Systems/Projman 2014—International Conference on Project Management/Hcist 2014—International Conference on Health and Social Care Information Systems and Technologies*. p 1238–1247.
- Gardel, L. S., Serra, L. A., Reis, R. L., & Gomes, M. E. (2014). Use of perfusion bioreactors and large animal models for long bone tissue engineering. *Tissue Engineering Part B- Reviews*, 20(2), 126–146.
- Gariboldi, M. I., & Best, S. M. (2015). Effect of ceramic scaffold architectural parameters on biological response. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 151.
- Gariboldi, M. I., Butler, R., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2019). Engineering vasculature: Architectural effects on microcapillary-like structure self-assembly. *PLoS One*, 14(1), e0210390.
- Gaspar, D. A., Gomide, V., & Monteiro, F. J. (2012). The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter*, 2(4), 167–75.
- Glowacki, J., Mizuno, S., & Greenberger, J. S. (1998). Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture. *Cell Transplantation*, 7(3), 319–326.
- Goggin, P. M., Zygalakis, K. C., Oreffo, R. O. C., & Schneider, P. (2016). High-resolution 3D imaging of osteocytes and computational modeling in mechanobiology: Insights on bone development, ageing, health and disease. *European Cells & Materials*, 31, 264–295.
- Goldstein, A. S., Juarez, T. M., Helmke, C. D., Gustin, M. C., & Mikos, A. G. (2001). Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22(11), 1279–1288.
- Gomes, M. E., Holtorf, H. L., Reis, R. L., & Mikos, A. G. (2006). Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Engineering*, 12(4), 801–809.
- Grayson, W. L., Bhumiratana, S., Cannizzaro, C., Chao, P. H., Lennon, D. P., Caplan, A. L., & Vunjak-Novakovic, G. (2008). Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Engineering. Part A*, 14(11), 1809–20.
- Grayson, W. L., Froehlich, M., Yeager, K., Bhumiratana, S., Chan, M. E., Cannizzaro, C., ... Vunjak-Novakovic, G. (2010). Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3299–3304.
- Grayson, W. L., Marolt, D., Bhumiratana, S., Froehlich, M., Guo, X. E., & Vunjak-Novakovic, G. (2011). Optimizing the medium perfusion rate in bone tissue engineering bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(5), 1159–1170.
- Guan, A., Hamilton, P., Wang, Y., Gorbet, M., Li, Z. Y., & Phillips, K. S. (2017). Medical devices on chips. *Nature Biomedical Engineering*, 1(3).
- Gusmao, C. V., & Belangero, W. D. (2009). How do bone cells sense mechanical loading? *Revista Brasileira de Ortopedia*, 44(4), 299–305.
- Guyot, Y. 2015. A multiphysics multiscale computational framework for the simulation of perfusion bioreactor processes in bone tissue engineering. Université de Liège.
- Guyot, Y., Papantoniou, I., Chai, Y. C., Van Bael, S., Schrooten, J., & Geris, L. (2014). A computational model for cell/ECM growth on 3D surfaces using the level set method: A bone tissue engineering case study. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 13(6), 1361–1371.

- Han, H. S., Ju, F., & Geng, S. (2018). In vivo and in vitro effects of PTH1-34 on osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells through regulating microRNA-155. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(4), 3220–3235.
- Hannink, G., & Arts, J. J. C. (2011). Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury—International Journal of the Care of the Injured*, 42, S22–S25.
- Haque, N., Rahman, M. T., Abu Kasim, N. H., & Alabsi, A. M. (2013). Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *The Scientific World Journal*, 2013, 632972.
- Holtorf, H. L., Datta, N., Jansen, J. A., & Mikos, A. G. (2005). Scaffold mesh size affects the osteoblastic differentiation of seeded marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 74A(2), 171–180.
- Holtorf, H. L., Sheffield, T. L., Ambrose, C. G., Jansen, J. A., & Mikos, A. G. (2005). Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(9), 1238–1248.
- Hu, Y. X., Lou, B., Wu, X. F., Wu, R. R., Wang, H. H., Gao, L. Y., ... Xu, Y. Y. (2018). Comparative study on in vitro culture of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*, 2018, 6704583.
- Inal, S., Hama, A., Ferro, M., Pitsalidis, C., Oziat, J., Iandolo, D., ... Owens, R. M. (2017). Conducting polymers scaffolds for hosting and monitoring 3D cell culture. *Advanced Biosystems*, 1(6), 1700052.
- Ishida, S. (2018). Organ-on-a-chip: Current applications and consideration points for in vitro ADME-Tox studies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 33(1), 49–54.
- Ivanovic, Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *Journal of Cellular Physiology*, 219(2), 271–5.
- Jaasma, M. J., & O'Brien, F. J. (2008). Mechanical stimulation of osteoblasts using steady and dynamic fluid flow. *Tissue Engineering. Part A*, 14(7), 1213–1223.
- Jagodzinski, M., Breitbart, A., Wehmeier, M., Hesse, E., Haasper, C., Krettek, C., ... Hankemeier, S. (2008). Influence of perfusion and cyclic compression on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in 3-dimensional culture. *Journal of Biomechanics*, 41(9), 1885–91.
- Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Boulefour, W., Thomas, M., Laurent, C., ... Malaval, L. (2017). Macrotopographic closure promotes tissue growth and osteogenesis in vitro. *Acta Biomaterialia*, 53, 536–548.
- Junaid, A., Mashaghi, A., Hankemeier, T., & Vulto, P. (2017). An end-user perspective on Organ-on-a-chip: Assays and usability aspects. *Current Opinion in Biomedical Engineering*.
- 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. *Medical Engineering & Physics*, 31(4), 420–427.
- Karsenty, G., & Mera, P. (2018). Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle. *Bone*, 115, 43–49.
- Kavlock, K. D., & Goldstein, A. S. (2011). Effect of pulse frequency on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a pulsatile perfusion bioreactor. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the ASME*, 133(9), 091005.
- Keller, J., & Schinke, T. (2013). The role of the gastrointestinal tract in calcium homeostasis and bone remodeling. *Osteoporosis International*, 24(11), 2737–2748.
- Keogh, M. B., O'Brien, F. J., & Daly, J. S. (2010). A novel collagen scaffold supports human osteogenesis—applications for bone tissue engineering. *Cell and Tissue Research*, 340(1), 169–177.
- Khodagholy, D., Rivnay, J., Sessolo, M., Gurfinkel, M., Leleux, P., Jimison, L. H., ... Malliaras, G. G. (2013). High transconductance organic electrochemical transistors. *Nature Communications*, 4, 2133.
- Kieninger, J., Weltin, A., Flamm, H., & Urban, G. A. (2018). Microsensor systems for cell metabolism—from 2D culture to organ-on-a-chip. *Lab on a Chip*, 18(9), 1274–1291.
- Kimura, H., Sakai, Y., & Fujii, T. (2018). Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 33(1), 43–48.
- Kleinhans, C., Mohan, R. R., Vacun, G., Schwarz, T., Haller, B., Sun, Y., ... Walles, H. (2015). A perfusion bioreactor system efficiently generates cell-loaded bone substitute materials for addressing critical size bone defects. *Biotechnology Journal*, 10(11), 1727–1738. and others.
- Kwon, S. Y., Chun, S. Y., Ha, Y. S., Kim, D. H., Kim, J., Song, P. H., ... Kwon, T. G. (2017). Hypoxia enhances cell properties of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(5), 595–604.
- Li, D., Dai, K., & Tang, T. (2008). Effects of dextran on proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 10(6), 587–596.
- Li, D., Tang, T., Lu, J., & Dai, K. (2009). Effects of flow shear stress and mass transport on the construction of a large-scale tissue-engineered bone in a perfusion bioreactor. *Tissue Engineering. Part A*, 15(10), 2773–83.
- Li, J., Rose, E., Frances, D., Sun, Y., & You, L. D. (2012). Effect of oscillating fluid flow stimulation on osteocyte mRNA expression. *Journal of Biomechanics*, 45(2), 247–251.
- Li, Y., Luo, Y. F., Huang, K., Xing, J., Xie, Z., Lin, M. P., ... Wang, Y. L. (2013). The responses of osteoblasts to fluid shear stress depend on substrate chemistries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539(1), 38–50.
- Li, Y., Luo, Y. F., Xie, Z., Xing, J., Lin, M. P., Yang, L., ... Huang, K. (2013). The optimal combination of substrate chemistry with physiological fluid shear stress. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 112, 51–60.
- Li, Y., Wang, J. F., Xing, J., Wang, Y. L., & Luo, Y. F. (2016). Surface chemistry regulates the sensitivity and tolerability of osteoblasts to various magnitudes of fluid shear stress. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 104(12), 2978–2991.
- Liu, B. Y., Han, S. Y., Hedrick, B. P., Modares-Sadeghi, Y., & Lynch, M. E. (2018). Perfusion applied to a 3D model of bone metastasis results in uniformly dispersed mechanical stimuli. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(4), 1076–1085.
- Liu, C., Abedian, R., Meister, R., Haasper, C., Hurschler, C., Krettek, C., ... Jagodzinski, M. (2012). Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. *Biomaterials*, 33(4), 1052–64.
- Maes, F., Claessens, T., Moesen, M., Van Oosterwyck, H., Van Ransbeeck, P., & Verdonck, P. (2012). Computational models for wall shear stress estimation in scaffolds: A comparative study of two complete geometries. *Journal of Biomechanics*, 45(9), 1586–1592.
- Marchat, D., & Champion, E. (2017). Ceramic devices for bone regeneration. Mechanical and clinical issues and new perspectives. *Advances in ceramic biomaterials. Materials, Devices and Challenges*, 279–311.
- Marin, A. C., & Lacroix, D. (2015). The inter-sample structural variability of regular tissue-engineered scaffolds significantly affects the micro-mechanical local cell environment. *Interface Focus*, 5(2), 20140097.
- Martin, I., Smith, T., & Wendt, D. (2009). Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products. *Trends in Biotechnology*, 27(9), 495–502.
- Martin, I., Wendt, D., & Heberer, M. (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 22(2), 80–86.
- Martinez-Vazquez, F. J., Pajares, A., Guiberteau, F., & Miranda, P. (2014). Effect of polymer infiltration on the flexural behavior of beta-tricalcium phosphate robocast scaffolds. *Materials*, 7(5), 4001–4018.
- Maurel, D. B., Jahn, K., & Lara-Castillo, N. (2017). Muscle-bone crosstalk: Emerging opportunities for novel therapeutic approaches to treat musculoskeletal pathologies. *Biomedicine*, 5(4).
- McCabe, L. R., & Parameswaran, N. (2017). Understanding the Gut-Bone Signaling Axis. Springer.

- 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6), 1583–1594.
- McCoy, R. J., & O'Brien, F. J. (2010). Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: A review. *Tissue Engineering Part B- Reviews*, 16(6), 587–601.
- Melchels, F. P. W., Barradas, A. M. C., van Blitterswijk, C. A., de Boer, J., Feijen, J., & Grijpma, D. W. (2010). Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. *Acta Biomaterialia*, 6(11), 4208–4217.
- Min, S., Lee, T., Lee, S. H., & Hong, J. (2018). Theoretical study of the effect of piezoelectric bone matrix on transient fluid flow in the osteonal lacunocanalicular. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(8), 2239–2249.
- Monfoulet, L. E., Becquart, P., Marchat, D., Vandamme, K., Bourguignon, M., Pacard, E., ... Logeart-Avramoglou, D. (2014). The pH in the microenvironment of human mesenchymal stem cells is a critical factor for optimal osteogenesis in tissue-engineered constructs. *Tissue Engineering. Part A*, 20(13–14), 1827–1840.
- Mueller, S. M., Mizuno, S., Gerstenfeld, L. C., & Glowacki, J. (1999). Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(12), 2118–2126.
- Nerem, R. M. (2014). Stem cell engineering. *Tissue Engineering. Part A*, 20(5–6), 893–894.
- Nishimura, I., Hisanaga, R., Sato, T., Arano, T., Nomoto, S., Ikada, Y., & Yoshinari, M. (2015). Effect of osteogenic differentiation medium on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional culture with radial flow bioreactor. *Regenerative Therapy*, 2, 24–31.
- Nonnis, S., Maffioli, E., Zanotti, L., Santagata, F., Negri, A., Viola, A., ... Tedeschi, G. (2016). Effect of fetal bovine serum in culture media on MS analysis of mesenchymal stromal cells secretome. *EuPA Open Proteom*, 10, 28–30.
- Olivares, A. L., Marshal, E., Planell, J. A., & Lacroix, D. (2009). Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. *Biomaterials*, 30(30), 6142–6149.
- Owan, I., Burr, D. B., Turner, C. H., Qiu, J. Y., Tu, Y., Onyia, J. E., & Duncan, R. L. (1997). Mechanotransduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 273(3), C810–C815.
- Owen, R., & Reilly, G. C. (2018). In vitro models of bone remodelling and associated disorders. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 134.
- Papadimitropoulos, A., Scherberich, A., Guven, S., Theilgaard, N., Croijmans, H. J. A., Santini, F., ... Martin, I. (2011). A 3d in vitro bone organ model using human progenitor cells. *European Cells & Materials*, 21, 445–458.
- Paul, G. R., Malhotra, A., & Muller, R. (2018). Mechanical stimuli in the local in vivo environment in bone: Computational approaches linking organ-scale loads to cellular signals. *Current Osteoporosis Reports*, 16(4), 395–403.
- Piroso, A., Gottardi, R., Alexander, P. G., & Tuan, R. S. (2018). Engineering in vitro stem cell-based vascularized bone models for drug screening and predictive toxicology. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 112.
- Qian, X., Yuan, F., Zhimin, Z., & Anchun, M. (2013). Dynamic perfusion bioreactor system for 3D culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells on nanohydroxyapatite/polyamide 66 scaffold in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 101(6), 893–901.
- Ratcliffe, A., & Niklason, L. E. (2002). Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Reparative Medicine: Growing Tissues and Organs*, 961, 210–215.
- Rauh, J., Milan, F., Gunther, K. P., & Stiehler, M. (2011). Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue Engineering Part B- Reviews*, 17(4), 263–280.
- Rivnay, J., Inal, S., Salleo, A., Owens, R. M., Berggren, M., & Malliaras, G. G. (2018). Organic electrochemical transistors. *Nature Reviews Materials*, 3(2), 17086.
- Rivnay, J., Leleux, P., Sessolo, M., Khodagholy, D., Herve, T., Focchi, M., & Malliaras, G. G. (2013). Organic electrochemical transistors with maximum transconductance at zero gate bias. *Advanced Materials*, 25(48), 7010–7014.
- Rockville, M. (2004). Bone health and osteoporosis: A report of the surgeon general. U.S. Department of Health and Human Services.
- Rumpler, M., Woesz, A., Dunlop, J. W. C., van Dongen, J. T., & Fratzl, P. (2008). The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(27), 1173–1180.
- Saiz, E., Zimmermann, E. A., Lee, J. S., Wegst, U. G. K., & Tomsia, A. P. (2013). Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dental Materials*, 29(1), 103–115.
- Salter, E., Goh, B., Hung, B., Hutton, D., Ghone, N., & Grayson, W. L. (2012). Bone tissue engineering bioreactors: A role in the clinic? *Tissue Engineering Part B- Reviews*, 18(1), 62–75.
- Sato, M., Asada, N., Kawano, Y., Wakahashi, K., Minagawa, K., Kawano, H., ... Katayama, Y. (2013). Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metabolism*, 18(5), 749–58.
- Scheinpflug, J., Pfeifferberger, M., Damerou, A., Schwarz, F., Textor, M., Lang, A., ... Schulze, F. (2018). Journey into bone models: A review. *Genes*, 9(5), 24–27.
- Shirakawa, J., De Jesus, D. F., & Kulkarni, R. N. (2017). Exploring inter-organ crosstalk to uncover mechanisms that regulate beta-cell function and mass. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71(7), 896–903.
- Sikavitsas, V. I., Bancroft, G. N., Holtorf, H. L., Jansen, J. A., & Mikos, A. G. (2003). Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 14683–14688.
- Sinlapabodin, S., Amornsudthiwat, P., Damrongsakkul, S., & Kanokpanont, S. (2016). An axial distribution of seeding, proliferation, and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells and rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells across a 3D Thai silk fibroin/gelatin/hydroxyapatite scaffold in a perfusion bioreactor. *Materials Science & Engineering C- Materials for Biological Applications*, 58, 960–970.
- Sola-Ruiz, M. F., Perez-Martinez, C., Martin-del-Llano, J. J., Carda-Batalla, C., & Labaig-Rueda, C. (2015). In vitro preliminary study of osteoblast response to surface roughness of titanium discs and topical application of melatonin. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 20(1), E88–E93.
- Sonnaert, M., Papantoniou, I., Bloemen, V., Kerckhofs, G., Luyten, F. P., & Schrooten, J. (2017). Human periosteal-derived cell expansion in a perfusion bioreactor system: Proliferation, differentiation and extracellular matrix formation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(2), 519–530.
- Spencer, J. A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., Runnels, J. M., ... Lin, C. P. (2014). Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*, 508(7495), 269–73.
- Stiehler, M., Bunker, C., Baatrup, A., Lind, M., Kassem, M., & Mygind, T. (2009). Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 89A(1), 96–107.
- Stops, A. J. F., Heraty, K. B., Browne, M., O'Brien, F. J., & McHugh, P. E. (2010). A prediction of cell differentiation and proliferation within a collagen-glycosaminoglycan scaffold subjected to mechanical strain and perfusive fluid flow. *Journal of Biomechanics*, 43(4), 618–626.
- Streuli, C. H. (2009). Integrins and cell-fate determination. *Journal of Cell Science*, 122(2), 171–177.
- Su, W. T., Wang, Y. T., & Chou, C. M. (2014). Optimal fluid flow enhanced mineralization of MG-63 cells in porous chitosan scaffold. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(4), 1111–1118.

- Szpalski, C., Sagebin, F., Barbaro, M., & Warren, S. M. (2013). The influence of environmental factors on bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials*, 101B(4), 663–675.
- Tandon, N., Marolt, D., Cimetta, E., & Vunjak- Novakovic, G. (2013). Bioreactor engineering of stem cell environments. *Biotechnology Advances*, 31(7), 1020–1031.
- Tetsuka, K., Ohbuchi, M., & Tabata, K. (2017). Recent progress in hepatocyte culture models and their application to the assessment of drug metabolism, transport, and toxicity in drug discovery: The value of tissue engineering for the successful development of a microphysiological system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(9), 2302–2311.
- Tovar- Lopez, F. J., Dominguez- Hernandez, V. M., Diez- Garcia, M. D., & Araujo- Monsalvo, V. M. (2014). Finite- element analysis of the effect of basic hip movements on the mechanical stimulus within a proximal femur. *Revista De Investigacion Clinica- Clinical and Translational Investigation*, 66, S32–S38.
- VanGordon, S. B., Voronov, R. S., Blue, T. B., Shambaugh, R. L., Papavassiliou, D. V., & Sikavitsas, V. I. (2011). Effects of scaffold architecture on preosteoblastic cultures under continuous fluid shear. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(2), 620–629.
- Vazquez, M., Evans, B. A. J., Riccardi, D., Evans, S. L., Ralphs, J. R., Dillingham, C. M., & Mason, D. J. (2014). A new method to investigate how mechanical loading of osteocytes controls osteoblasts. *Frontiers in Endocrinology*, 208.
- Vervloet, M. G., Massy, Z. A., Brandenburg, V. M., Mazzaferro, S., Cozzolino, M., Urena- Torres, P., ... Goldsmith, D. (2014). Bone: A new endocrine organ at the heart of chronic kidney disease and mineral and bone disorders. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(5), 427–436.
- Vetsch, J. R., Betts, D. C., Muller, R., & Hofmann, S. (2017). Flow velocity- driven differentiation of human mesenchymal stromal cells in silk fibroin scaffolds: A combined experimental and computational approach. *PLoS One*, 12(7), e0180781.
- Vetsch, J. R., Hofmann, S., & Müller, R. (2015). Perfusion bioreactors for bone tissue engineering—A combined experimental and computational approach [Diss., Eidgenössische Technische Hochschule ETH Zürich, Nr 22998]. 1 Band p.
- Vetsch, J. R., Paulsen, S. J., Muller, R., & Hofmann, S. (2015). Effect of fetal bovine serum on mineralization in silk fibroin scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 13, 277–285.
- Vitte, J., Benoliel, A. M., Pierres, A., & Bongrand, P. (2004). Is there a predictable relationship between surface physical- chemical properties and cell behaviour at the interface? *European Cells & Materials*, 7, 52–63.
- 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. *Journal of Biomechanics*, 43(7), 1279–1286.
- Wedrychowicz, A., Sztefko, K., & Starzyk, J. B. (2018). Sclerostin and its significance for children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1D). *Bone*.
- Wei, Z. Y., Batagov, A. O., Carter, D. R. F., & Krichevsky, A. M. (2016). Fetal bovine serum RNA interferes with the cell culture derived extracellular RNA. *Scientific Reports*, 6.
- Weinbaum, S., Cowin, S. C., & Zeng, Y. (1994). A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading- induced bone fluid shear stresses. *Journal of Biomechanics*, 27(3), 339–360.
- Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I., & Pearcy, M. J. (2005). Mediation of biomaterial- cell interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Engineering*, 11(1- 2), 1–18.
- Wittkowske, C., Reilly, G. C., Lacroix, D., & Perrault, C. M. (2016). In vitro bone cell models: Impact of fluid shear stress on bone formation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 87.
- Wu, X. G., Wang, N. N., Wang, Z. W., Yu, W. L., Wang, Y. Q., Guo, Y., & Chen, W. Y. (2016). Mathematically modeling fluid flow and fluid shear stress in the canaliculi of a loaded osteon. *Biomedical Engineering Online*, 15.
- Yeatts, A. B., & Fisher, J. P. (2011). Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone*, 48(2), 171–181.
- You, L. D., Weinbaum, S., Cowin, S. C., & Schaffler, M. B. (2004). Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anatomical Record Part a- Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 278A(2), 505–513.
- Zaidi, M., Yuen, T., Sun, L., & Rosen, C. J. (2018). Regulation of skeletal homeostasis. *Endocrine Reviews*, 39(5), 701–718.
- Zhang, X. X., Lan, Y. J., Xu, J. Y., Quan, F., Zhao, E. J., Deng, C. Y., ... Yan, M. (2019). CellMarker: A manually curated resource of cell markers in human and mouse. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D721–D728. and others.
- Zhang, Y. S., Aleman, J., Shin, S. R., Kilic, T., Kim, D., Shaegh, S. A. M., ... Khademhosseini, A. (2017). Multisensor- integrated organs- on- chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(12), E2293–E2302. and others.
- Zhao, F. H., Vaughan, T. J., & McNamara, L. M. (2016). Quantification of fluid shear stress in bone tissue engineering scaffolds with spherical and cubical pore architectures. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 15(3), 561–577.
- Zhou, Q., Castaneda Ocampo, O., Guimaraes, C. F., Kuhn, P. T., van Kooten, T. G., & van Rijn, P. (2017). Screening platform for cell contact guidance based on inorganic biomaterial micro/nanotopographical gradients. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(37), 31433–31445.
- Zhu, S., Ehnert, S., Rouss, M., Haussling, V., Aspera- Werz, R. H., Chen, T., & Nussler, A. K. (2018). From the clinical problem to the basic research- co- culture models of osteoblasts and osteoclasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8).
- Ming, W. Z., Yu, L. J., Xin, L. R., Hao, L., Yong, G., Lu, L., ... Zheng, Z. X. (2013). Bone formation in rabbit cancellous bone explant culture model is enhanced by mechanical load. *Biomedical Engineering Online*, 12, 35.

How to cite this article: Hadida M, Marchat D. Strategy for achieving standardized bone models. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019;1–21. <https://doi.org/10.1002/bit.27171>

Chapitre II. Développement et conception

II Développement et conception du système de culture

II.1 Les systèmes de culture perfusés : état des lieux et fonctions clés

II.1.1 Limites des systèmes commerciaux et des prototypes actuels

Le rôle premier d'un bioréacteur est de maintenir un environnement rigoureusement contrôlé dans le but de recréer les conditions permettant le déroulement naturel des mécanismes biologiques que l'on souhaite étudier (Rauh et al. 2011). En ingénierie tissulaire osseuse, l'absence de standard et la variété des dispositifs, supports de culture et protocoles employés rendent pratiquement impossible la reproduction de l'environnement mécanique et chimique d'une étude à l'autre, compromettant ainsi la généralisation des résultats biologiques observés.

Quelques industriels seulement (e.g., BOSE, Instron) commercialisent des systèmes complets de cultures perfusées (Figure 5). Ces systèmes sont néanmoins souvent conçus de façon déconnectée des contraintes spécifiques à la discipline et à la plupart des laboratoires. Notamment, les volumes élevés de milieu de culture nécessaires rendent ces dispositifs extrêmement coûteux à l'utilisation. Ces bioréacteurs peuvent également se révéler particulièrement difficiles à manipuler en conditions stériles (e.g., grands nombres de pièces à associer, outillage spécifique nécessaire à l'assemblage, connections des tubes mal placées, encombrement).

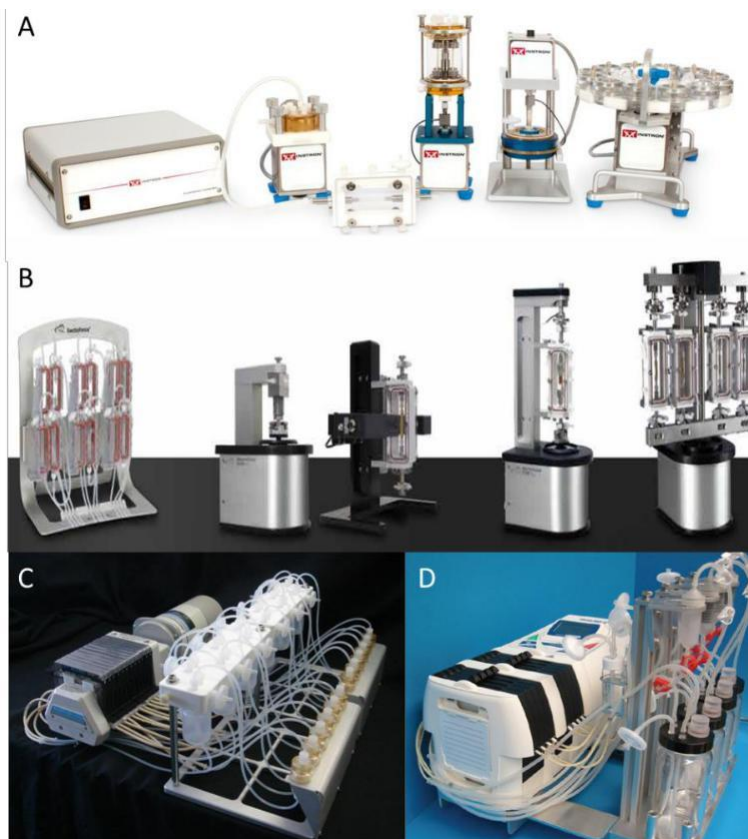


Figure 5 | Bioréacteurs industriels.

Bioréacteurs à perfusion ou gamme de bioréacteurs à perfusion commercialisés par (A) BISS-Instron, (B) TA instruments-Bose, (C) Osteogen de BISS et (D) 3DBiotek de Sigma-Aldrich.

L'offre limitée des bioréacteurs perfusés industriels et leurs limites ont poussé de nombreuses équipes à développer leur propre dispositif (Figure 6). Le design de ces dispositifs est généralement pensé pour 47

une famille d'expériences restreintes, et limités par le budget et le domaine d'expertise de l'équipe de recherche, exacerbant les problématiques de généralisation des résultats. Par exemple, le système de perfusion monté par Qian et collaborateurs (**Figure 6A**) est composé de colonnes de pastilles poreuses (nanohydroxyapatite/polyamide-66) empilées dans des tubes à essai maintenus à la verticale ([Qian et al. 2013](#)). La simplicité de ce système permet de profiter des avantages d'un système de culture perfusé avec un budget et un équipement limité. Cependant, l'impossibilité de piloter précisément l'environnement mécanique rend ce montage inadéquat pour des études systématiques du comportement de cellules en fonction des paramètres de cultures ou encore l'élaboration standardisée de modèles précis de tissus osseux. Le bioréacteur perfusé Synthecon (**Figure 2B**) destiné

à la perfusion de supports de culture tubulaires est constitué de nombreuses pièces et d'un protocole de montage fastidieux, source de variabilité inter-opérateur et d'un risque accru de contamination des cultures.

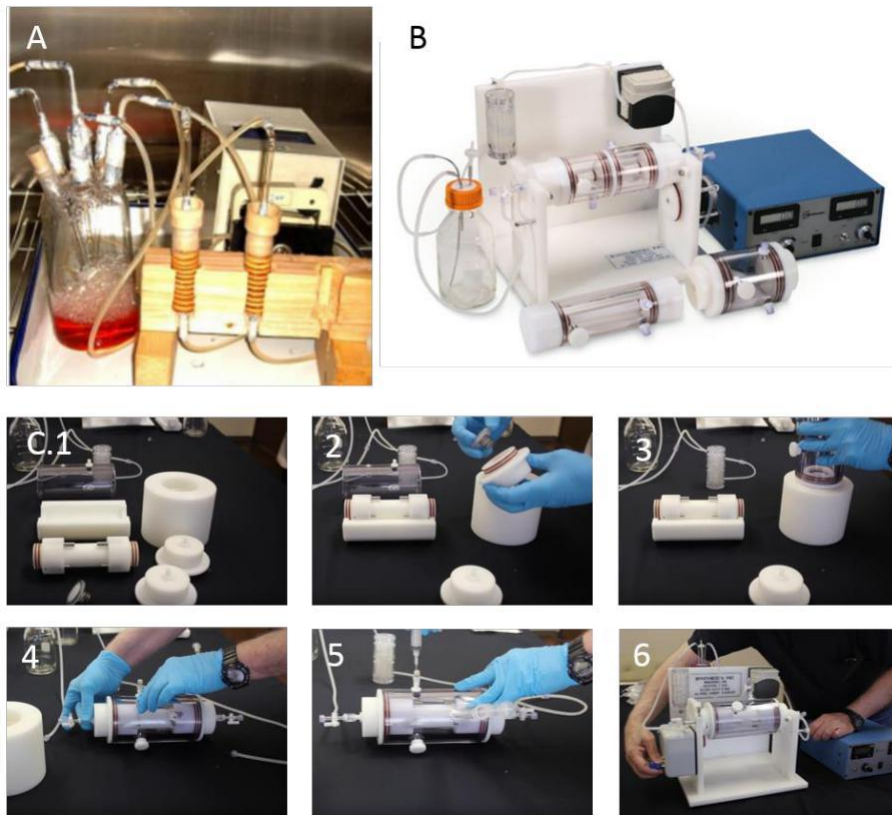


Figure 6 | Prototypes de laboratoire.

(A) Bioréacteur de Qian et collaborateurs, constitué d'une pompe péristaltique, d'un réservoir de milieu de culture, et de chambres de perfusions contenant chacune 11 pastilles poreuses de nanohydroxyapatite-polyamide-66, (B) bioréacteur Synthecon RCCMax et (C) Étapes de montages du bioréacteur Synthecon RCCMax : (1) pièces principales de la chambre de culture (2) installation manuelle du filtre dans l'opercule d'entrée de fluide (3) press-fitting de l'opercule et de l'enceinte cylindrique de la chambre à l'aide d'un outil spécialisé (4) Installation des supports de culture, fermeture du dispositif, installation des valves et de la connectique (5) Évacuation de l'air piégé dans l'enceinte en pressant simultanément une seringue de milieu de culture et en tirant une seconde seringue positionnée à la verticale (6) Installation de la chambre, du réservoir de milieu et de l'oxygénateur sur le support dédié, et connexion du moteur, de la pompe péristaltique et de l'alimentation électrique.

Certains prototypes ont toutefois réussi à dépasser le cadre de leur laboratoire d'origine du fait de la volonté de leurs inventeurs et bien entendu de leur pertinence technique. Le meilleur exemple reste le bioréacteur commercial U-CUP (**Figure 7**). Inventé par l'équipe du Professeur Ivan MARTIN (Department Biomedizin, de l'Hôpital Universitaire de Basel) et commercialisé par la société CELLEC

Biotek AG, ce système a été développé pour faciliter la culture de tissus vivants en 3D pour des applications thérapeutiques (e.g., greffes, criblage de médicaments) ou de recherches (e.g., développement de tissus). Les études réalisées avec U-CUP ont notamment permis de montrer que la perfusion oscillante, généralisée sur ce système, peut permettre un ensemencement maîtrisé (Papadimitropoulos et al. 2013; Wendt et al. 2006b) ainsi que la culture pendant 21 jours de cellules souches osseuses (Moser et al. 2018). Néanmoins, la configuration et les choix techniques du U-CUP, dédiés à une perfusion oscillante bidirectionnelle, limitent sa plage de fonctionnalités. La perfusion continue y est ainsi impossible, alors que ce mode de culture reste le plus plébiscité. En outre, il ne permet pas l'acquisition d'image, n'assure pas l'étanchéité du support de culture dans la chambre (pas de press fitting) (Figure 7C) et surtout impose une stimulation mécanique dynamique aux cellules ensemencées dans le support de culture (voir Chapitre I section 4.4.3 de la revue).

Les limites de ces dispositifs mettent en avant le besoin de systèmes innovants et polyvalents permettant l'identification des relations entre les paramètres de culture et la réponse cellulaire, et par la suite le développement de protocoles de culture standardisés en fonction de la question scientifique poursuivie. En plus de l'ergonomie et de la facilité de mise en œuvre du système, cet objectif requiert une évolution des techniques d'accès à l'information (« monitoring ») ainsi qu'un contrôle précis de l'environnement fluide.

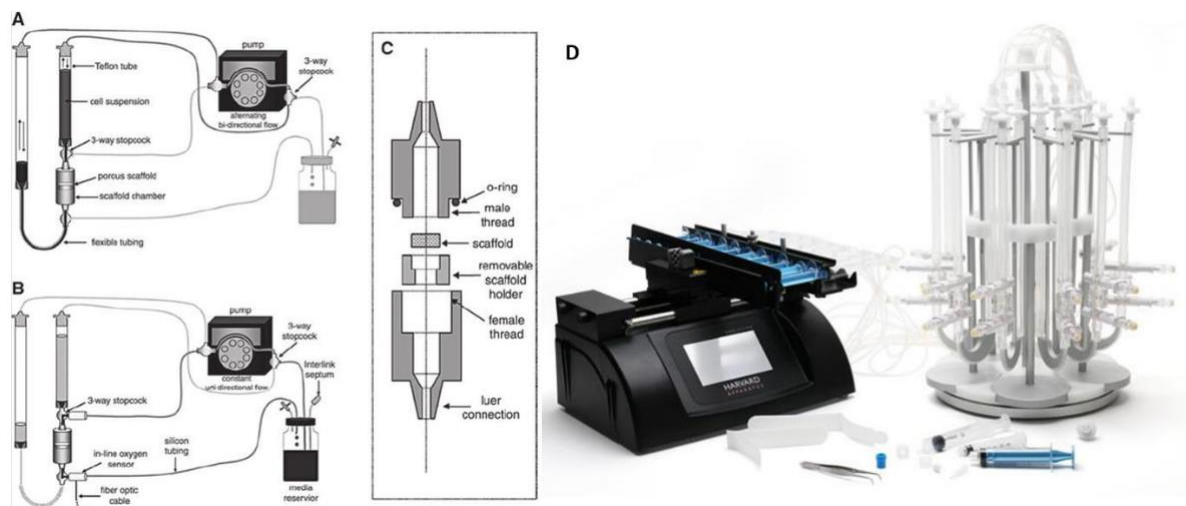


Figure 7 | Bioréacteur U-CUP de CELLEC Biotek AG.

(A) Schéma de fonctionnement du montage de perfusion, (B) Schéma de fonctionnement du montage de perfusion intégrant un capteur d'oxygène en ligne, (C) Structure et composants de la chambre de perfusion, (D) Photo du bioréacteur

U-CUP. L'unité de pressurisation par pompes à seringues (à gauche) peut alimenter jusqu'à 10 chambres de perfusion, visibles à droite sur un support dédié.

II.1.2 Le contrôle de l'environnement fluide

Comme développé précédemment (cf. Chapitre I, section 2 de la revue), l'environnement fluide à l'intérieur du réseau macroporeux du support de culture va définir à la fois les contraintes de cisaillement fluide appliquées aux cellules ainsi que les vitesses locales de circulation du milieu de culture, deux paramètres indépendants et cruciaux pour le devenir cellulaire (Li et al. 2008). Les contraintes de cisaillement modulent entre autres l'activité ostéogénique des cellules (Grayson et al. 2011). Les vitesses de circulations locales définissent quant à elles l'apport en oxygène, nutriments et métabolites, l'évacuation des déchets, mais également la communication paracrine.

Atteindre un niveau de contrôle de l'environnement fluide suffisant pour permettre la reproductibilité des études, ou la standardisation des cultures d'un essai ou d'un laboratoire à l'autre, nécessite la prise en compte de tous les composants et paramètres du circuit dans la démarche de conception d'un système de culture perfusée (Salehi-Nik et al. 2013). Ces composants incluent :

- la configuration et l'étanchéité du système de fixation du support de culture dans la chambre de culture (cf. Chapitre I, section 5.1.1 de la revue, et explications ci-après **Figure 8**),
- la géométrie du volume interne de cette chambre en amont et en aval du support de culture (cf. explications ci-après **Figure 9**),
- la consigne de perfusion (McCoy et al. 2012) et la capacité de la pompe sélectionnée à respecter cette consigne (cf. Chapitre I, section 4.4.3 de la revue, et explications ci-après **Figure 10**),
- l'architecture du support de culture (cf. Chapitre I sections 2.2, 4.2, 4.4.1 et 5.1.2 de la revue).

L'écoulement préférentiel des fluides étant défini par le chemin de moindre résistance, laisser le milieu s'écouler autour du support de culture empêche de contrôler précisément le flux qui le traverse. Il est donc impératif d'assurer une parfaite étanchéité entre le support et la chambre de culture. De plus, le choix et la configuration des joints d'étanchéité (Figure 8) modifient significativement les contraintes mécaniques qui sont appliquées aux cellules (Kleinhans et al. 2015) dans et à la surface du support de culture, affectant en conséquence leur distribution et leur viabilité (Du et al. 2015). Néanmoins, de nombreux systèmes récents négligent encore ce paramètre (Qian et al. 2013).

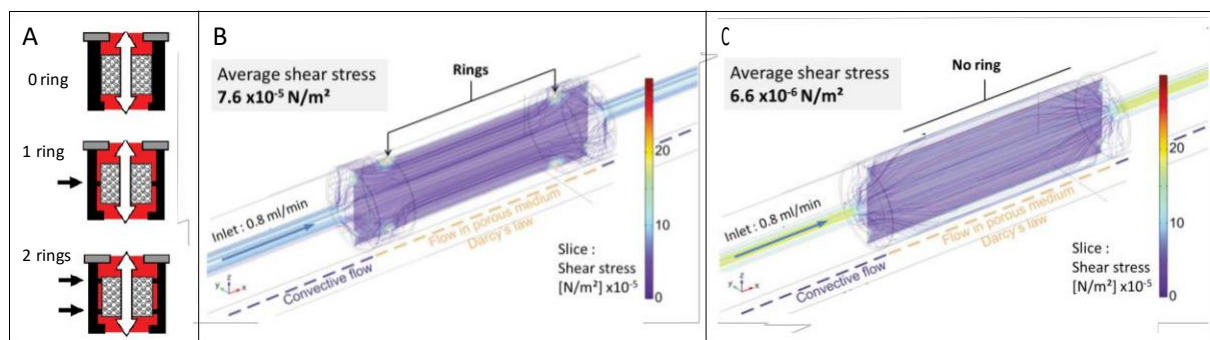


Figure 8 | Importance de la configuration des systèmes d'étanchéité au niveau des supports de culture.

(A) Illustrations de différentes configurations des joints d'étanchéité étudiées par (Du et al. 2015) avec 0, 1 ou 2 joints du type O-ring entre le support de culture et les parois de la chambre (Les flèches noires indiquent la position du ou des joints, les flèches blanches les sens de perfusion) ; (B) et (C) Modélisation d'un écoulement de 0,8 ml/min au sein d'une chambre de perfusion comportant un support de culture poreux (non représenté) avec ou sans joint O-ring (Kleinhans et al. 2015).

(B) La présence de 2 joints O-rings force les lignes de courant à l'intérieur du support de culture, au sein duquel la contrainte de cisaillement moyenne est estimée à $7,6 \times 10^{-5} \text{ N/m}^2$. (C) En l'absence de dispositif assurant l'étanchéité, le milieu de culture circule principalement autour du support de culture. Le cisaillement moyen calculé dans le support de culture pour cette configuration est de $6,6 \times 10^{-6} \text{ N/m}^2$, soit 11,5 fois moins que la configuration à 2 joints.

Au-delà des considérations d'étanchéité, la géométrie de la chambre de culture en amont et en aval du support de culture fait rarement l'objet d'études approfondies. Pourtant, il a été montré que la géométrie des chambres de culture pouvait induire des phénomènes parasites tels que la formation de tourbillons, conduisant à des (motifs d') écoulement irréguliers (Figure 9). Freitas et collaborateurs ont démontré que la configuration de la chambre de culture, et le positionnement du support, ont une influence notable sur la turbulence du flux et la vitesse de circulation du milieu autour du support (Figure 9A) (Freitas et al. 2014). Les diamètres d'entrée et de sortie du milieu sont également des paramètres influents sur la formation de tourbillons dans la chambre de culture (Figure 9B) (Vetsch et al. 2015). Assurer une perfusion homogène du support de culture nécessite donc une maîtrise du champ des vitesses dans l'intégralité du volume de la chambre pour les plages de débit considérées.

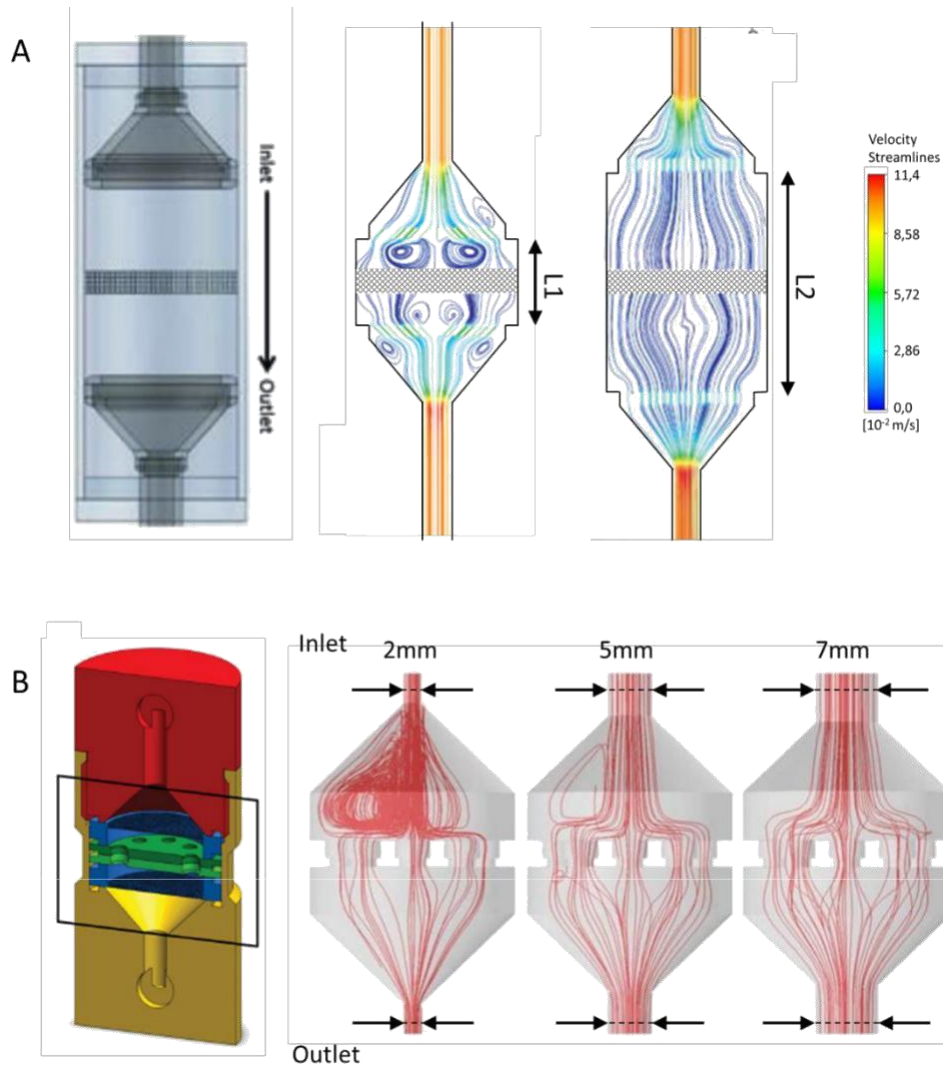


Figure 9 | Influence de la géométrie interne de la chambre de culture sur la circulation du milieu de culture.

(A) Dans la chambre de perfusion représentée à gauche, où la zone hachurée représente la position du support de culture, les distances entre le support de culture, l'entrée, et la sortie du milieu impactent la configuration des lignes de courant. Au centre, une simulation de ces lignes de courant pour une distance réduite entre l'entrée et la sortie du fluide « L1 » génère

des tourbillons et une perfusion irrégulière du support de culture. À droite, la simulation des lignes de courant pour une distance supérieure « L2 » montre un écoulement plus régulier (images modifiées à partir de (Freitas et al. 2014)). (B) Dans la chambre de culture représentée à gauche, 8 supports de culture, fixés dans la pièce représentée en vert, sont perfusés en parallèle. Les simulations des lignes de courant (en rouge) dans l'ensemble du volume du bioréacteur pour un débit fixe de 12 mL/min et pour différents diamètres d'entrée et sortie du fluide (2, 5, et 7 mm) montrent l'impact de ce paramètre sur

la formation de tourbillons. Cette figure illustre le processus d'amélioration incrémentale du design d'un bioréacteur. (images modifiées à partir de (Vetsch et al. 2015)).

Les pompes péristaltiques communément utilisées en laboratoire, notamment pour leur capacité à paralléliser les cultures (comme illustré sur les **Figure 5C** et **1D**) introduisent néanmoins un profil d'alimentation dynamique, comme présenté sur la **Figure 10A**, qui peut modifier le comportement cellulaire (cf. Chapitre I section 4.4.3 de la revue). La **Figure 10B** présente une réponse en débit stable à privilégier, ici celle de la pompe OB1 Mk3+ d'Elveflow (Paris, France).

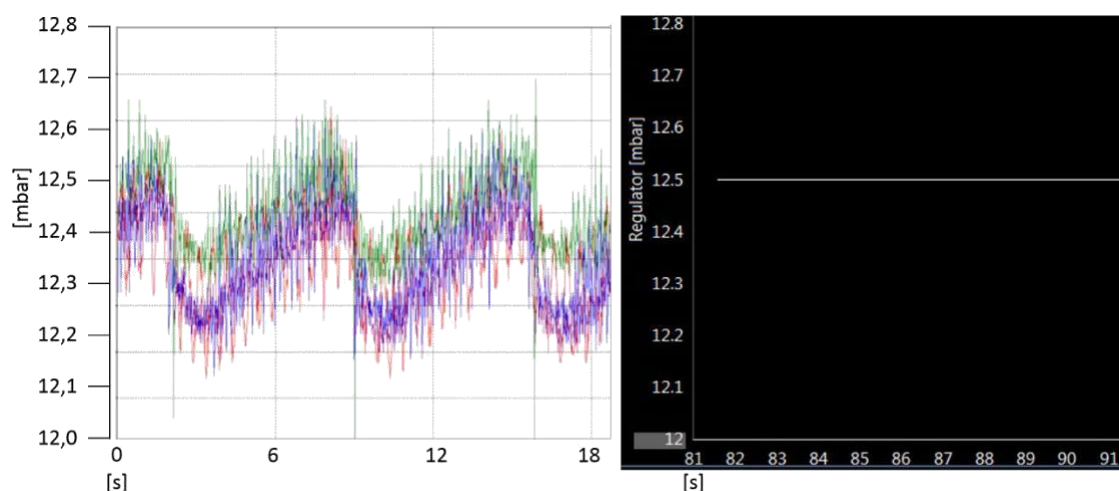


Figure 10 | Profils de pression générés par différents types de pompes.

(A) Les pompes péristaltiques génèrent une pression oscillante dont la fréquence et l’amplitude des oscillations dépend du modèle de la pompe et du débit utilisé. La courbe représente les variations de pression générées par une pompe ISMATEC Ecoline pour une consigne de débit de 1 mL/min. (B) L’unité de pressurisation OB1 Mk3+ (Elveflow, Paris) permet la génération d’une pression constante.

II.1.3 L’accès à l’information

Un autre facteur limitant majeur dans les études utilisant les systèmes de culture perfusés, par définition en 3D, est d’obtenir suffisamment de points de données pour permettre l’étude simultanée de plusieurs valeurs du paramètre d’intérêt avec un nombre d’échantillons suffisant pour atteindre une significativité statistique. En effet, les méthodes d’accès à l’information dans ces systèmes sont exclusivement destructives, telles que les méthodes d’immunohistochimie (*cf.* Chapitre I, section 5.2.1 de la revue), nécessitant un nombre d’échantillons considérable ; sans compter la main d’œuvre, le temps et l’expertise nécessaire à leur préparation (e.g., fixation, déshydratation, inclusion, coupe, marquage).

Des techniques d’accès à l’information non destructives, et en continu, réduiraient le temps de traitement associé aux méthodes traditionnelles, supprimeraient les limitations relatives au nombre de points de données et réduiraient considérablement le nombre de supports de culture nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs pour une multitude de temps de culture. Les capteurs en ligne, notamment basés sur les technologies OECT (*cf.* Chapitre I section 5.2.1 de la revue, et (Kilic et al. 2018; Temiz and Delamarche 2018) pour revue), constituent des candidats prometteurs, mais ne sont pas associés à des contraintes de conception particulières et ne seront donc pas développés ici. Les progrès en ingénierie tissulaire *in vitro* sont également accompagnés d’un besoin croissant de technologies d’imagerie permettant une analyse détaillée de l’intérieur des supports de culture, permettant une observation en haute définition et en temps réel tout au long de la période de culture (Paie et al. 2018).

La tomographie par cohérence optique (OCT ou TCO) permet de recréer une image en mesurant le temps de parcours de la lumière infrarouge rétrodiffusée par l’échantillon, sur un principe similaire à celui de l’échographie avec les ondes sonores. Cette technique non-ionisante et non invasive permet de générer des images 3D d’échantillons biologiques avec une résolution de quelques micromètres. Appliquée à l’os, l’OCT a permis d’observer la structure lamellaire de trabécules et les cellules présentes dans la moelle sans marquage préalable, avec une limite de pénétration d’environ 1 mm (Kasseck et al. 2010; Liang et al. 2009; Yang et al. 2006).

La microtomographie à rayons X (micro-CT) fournit une image 3D de l'intérieur d'un échantillon, quelle que soit sa taille, avec une résolution de 100 à 1 μm . Cette technique non destructive est souvent utilisée pour caractériser à la fois les supports de culture et la croissance osseuse *in vivo* (Cartmell et al. 2004). La combinaison de la micro-CT et des techniques plus récentes de micro-diffraction facilite la caractérisation qualitative et quantitative des supports de culture denses et l'évaluation du taux de croissance osseuse dans les tissus artificiels (Cancedda et al. 2007; Cartmell et al. 2004). La tomographie par rayonnement synchrotron (SRT) permet l'acquisition de résultats encore meilleurs en termes de résolution spatiale (inférieure à 1 μm) et de rapport signal/bruit. Cependant, les équipements permettant d'exécuter cette technique ne sont disponibles que dans quelques centres de recherche dans le monde, et les niveaux de rayonnements ionisants élevés ne permettent pas de travailler sur des tissus vivants.

La microscopie de fluorescence est une technique utilisant un microscope optique (dont certains concepts caractéristiques sont présentés **Figure 11**), équipé d'une source lumineuse d'une longueur d'onde précise correspondant à la fréquence d'excitation d'un fluorophore cible (**Figure 12A**). Les fluorophores, qui émettent des photons de fluorescence après excitation (**Figure 12B**), peuvent alors être associés à des anticorps pour identifier des particules et structures biologiques sur le principe de l'immunomarquage (Ramos-Vara 2005). Cette immunofluorescence peut être utilisée pour analyser la distribution de protéines, de glycanes, de molécules biologiques et non biologiques, ainsi que les structures qui interagissent avec ces molécules (Franke et al. 1978). En microscopie de fluorescence à champ large, l'ensemble de l'échantillon est éclairé par la source lumineuse. Lorsque l'échantillon à imager est épais, la fluorescence émise en dehors du plan focal empêche l'acquisition d'une image nette. En microscopie confocale, un sténopé (en anglais *pinhole*) placé devant le détecteur permet d'éliminer les photons ne provenant pas du plan focal et ainsi l'acquisition de coupes optiques nettes d'échantillons épais par balayages successifs. La microscopie de fluorescence à deux photons utilise des photons d'énergie inférieure à l'énergie d'excitation, l'excitation des fluorophores repose donc sur l'absorption simultanée de deux photons, qui n'est possible que dans le plan focal (**Figure 13**). Cette technique permet, par rapport à la microscopie confocale, la restriction de l'excitation à des volumes extrêmement fins, de l'ordre du femtolitre (**Figure 13B, 9C, Figure 14**). L'utilisation de lasers de fréquences plus faibles permet également une meilleure pénétration dans les tissus, de l'ordre du millimètre. Cette technique, associée à des micro-sondes, a notamment été utilisée pour mesurer *in vivo* et en direct la concentration en oxygène locale dans la moelle osseuse (Spencer et al. 2014a). Ces différents types de microscopes sont récapitulés **Figure 14**.

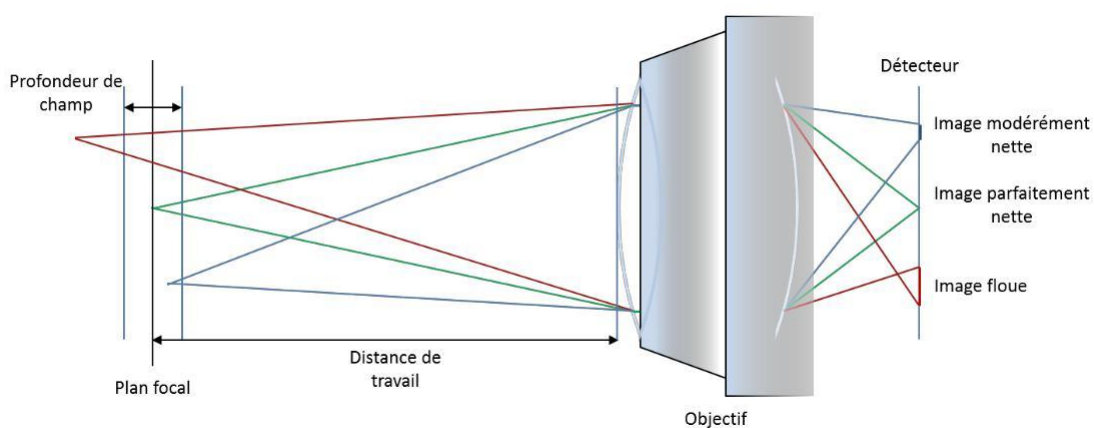


Figure 11 | Microscopie optique, profondeur de champ et distance de travail.

Les objets situés sur le plan focal sont résolus de façon parfaitement nette par l'objectif. La profondeur de champ d'un objectif est la distance caractérisant la partie de l'espace au sein de laquelle les objets observés produisent une image nette. La distance de travail de l'objectif est la distance entre l'objectif et le plan focal.

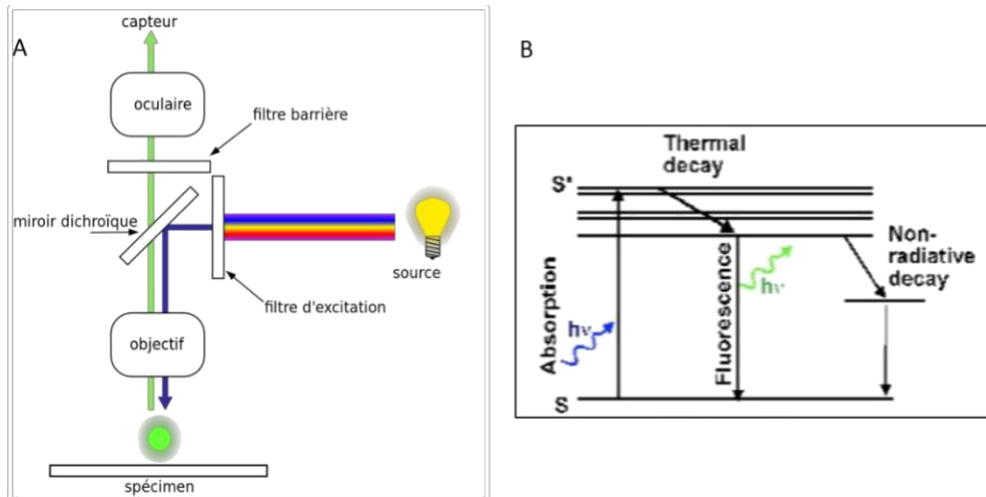


Figure 12 | Principe de la microscopie à fluorescence sous excitation à 1 photon.

(A) Composants et fonctionnement d'un microscope à fluorescence, (B) Diagramme de Jablonski représentant la relaxation par émission de fluorescence (en vert) après excitation par l'absorption d'un photon (en bleu), (C) pour une excitation linéaire (absorption monophotonique), la fluorescence est excitée sur la totalité du trajet du faisceau, l'ajout d'un sténopé (« pin hole », cf. **Figure 14B**) permet d'éliminer les photons émis en dehors du plan focal.

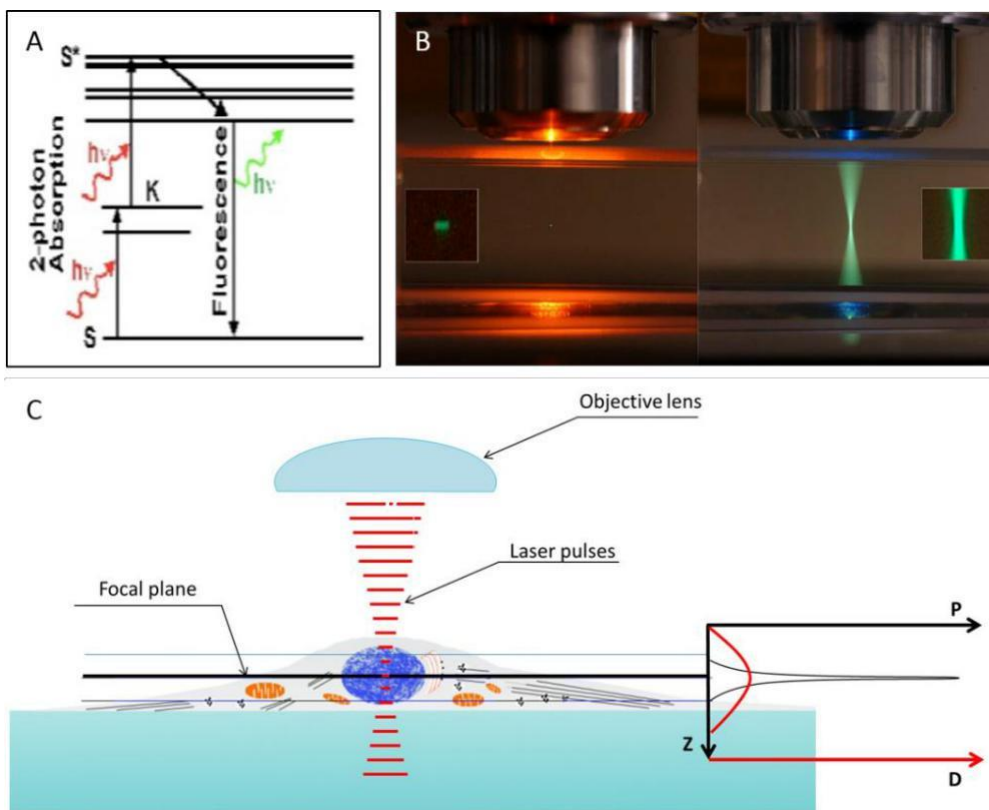


Figure 13 | Principe de la microscopie à fluorescence sous excitation à 2 photons.

(A) Diagramme de Jablonski représentant la relaxation par émission de fluorescence (en vert) après excitation par l'absorption de deux photons (en orange) d'énergie plus faible que la transition électronique SS^* . Ces photons peuvent se combiner et avoir le même effet qu'un photon d'énergie SS^* (Goppert-Mayer 2009), (B) Dans le cas d'une excitation à 2 photons, la fluorescence est confinée en 1 point, i.e., le point de focalisation de l'objectif du microscope, et ce sans l'ajout d'un sténopé. (C) dans ce cas l'excitation n'est réalisée que dans le plan focal car les 2 photons ne peuvent être absorbés en même temps qu'à cet endroit, permettant des analyses intracellulaires d'une grande précision.

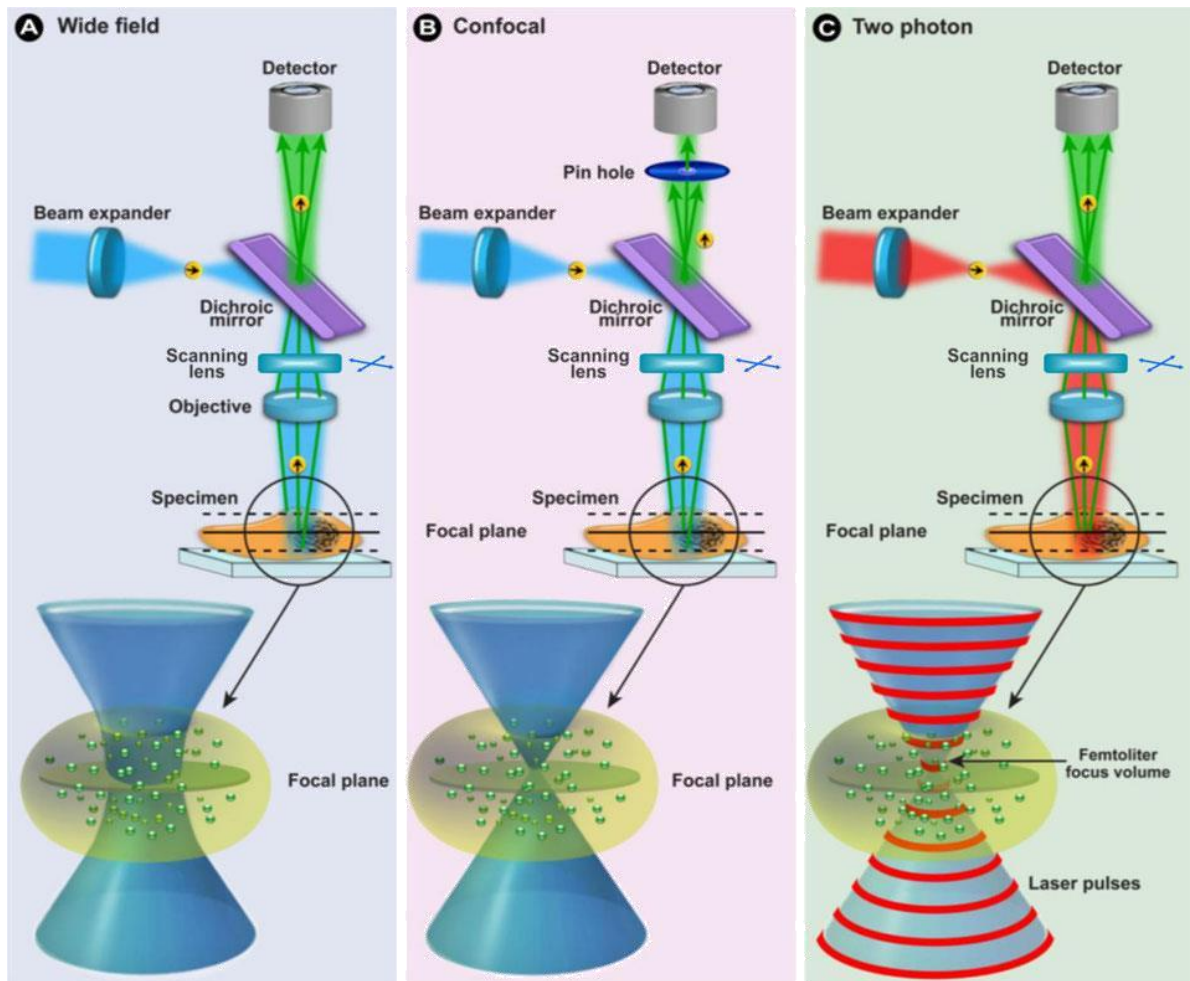


Figure 14 | Types de microscopes à fluorescence.

(A) Le microscope à champ large (microscope optique conventionnelle) capte l'ensemble des photons de fluorescence émis par l'échantillon. Pour un échantillon épais, les photons émis en dehors du plan focal vont parasiter l'image captée. (B) En microscopie confocale, l'ajout d'un sténopé (« pin hole ») permet d'éliminer les photons émis en dehors du plan focal et donc d'obtenir des coupes optiques plus ou moins nettes à partir d'échantillons épais. Balayer l'échantillon en variant la position du plan focal permet de reconstituer des images 3D. (C) En microscopie à deux photons, l'excitation du fluorophore est réalisée en provoquant l'interférence de deux photons d'énergie inférieure sur le plan focal. Cette technique permet de restreindre l'excitation de l'échantillon sur le plan focal et donc d'obtenir des coupes optiques nettes sans sténopé (« pin hole »).

II.2 Conception du dispositif de culture et d'ensemencement cellulaire

II.2.1 Choix techniques généraux de suivi des cultures et contraintes associées

La première étape de la conception d'un système permettant le contrôle précis de l'environnement fluide réside dans la sélection de l'unité de distribution du fluide. En plus de la fidélité de la pompe à la consigne de débit établie (cf. Chapitre II.1.2), un autre facteur de décision est la facilité d'intégration de la pompe à un circuit fluide complexe de composants programmables dans un but d'automatisation. Pour ces raisons, nous avons sélectionné la pompe à pression OB1Mk3 commercialisée par Elveflow, qui présente l'avantage d'assurer à la fois une réponse fiable (**Figure 10B**) et de disposer d'une gamme de capteurs, composants et accessoires (**Figure 15**) facilement programmables à l'aide d'une interface utilisateur intégrée, détaillés dans le Chapitre II.4.

La première stratégie de contrôle envisagée repose sur l'analyse de la composition chimique du milieu de culture. L'association de capteurs en ligne d'O₂, de pH, de glucose, mais également de marqueurs spécifiques à l'activité osseuse basés sur le principe des transistors électrochimiques organiques (OECT, voir Chapitre I section 5.2.1 de la revue), permettra un suivi avancé et en temps réel de l'activité cellulaire ((Kilic et al. 2018; Temiz and Delamarche 2018) pour revue). Ces capteurs étant simplement reliés au circuit de circulation du milieu de culture (**Figure 15**), leur implémentation n'impose pas de contraintes de conception particulières.

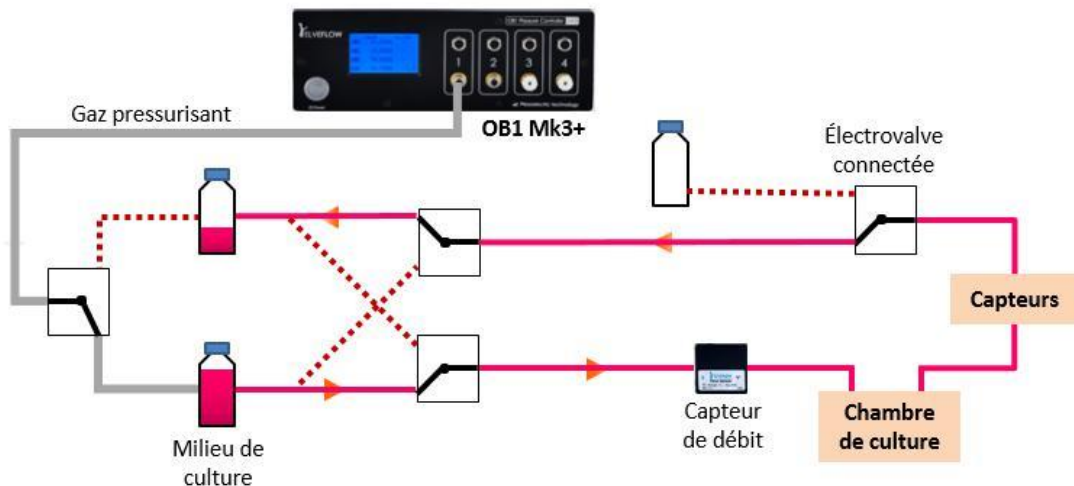


Figure 15 | Exemple de schéma général du système de culture perfusée. Système composé d'une chambre de culture, d'une unité de contrôle du débit piloté à l'aide d'un capteur de débit, de réservoirs de milieu et de prélèvements d'échantillon et de vannes

Du fait du potentiel des techniques de microscopie en fluorescence pour le suivi du devenir et de l'activité cellulaire (cf. Chapitre II.1.3), nous avons développé la chambre de culture afin qu'elle soit compatible avec l'utilisation de ces dispositifs optiques. Cette exigence constitue la contrainte principale du design de la chambre de culture, détaillé dans le Chapitre suivant II.2.2.

II.2.2 Ergonomie de la chambre de culture et contraintes de design associées

Les microscopes précédemment mentionnés existent en configurations dites « droite » ou « inversée » (**Figure 16**). En fonction de la configuration sélectionnée, le support sera observé par la face supérieure ou inférieure de la chambre de culture, qui devra être conçue dans un matériau transparent de qualité optique.

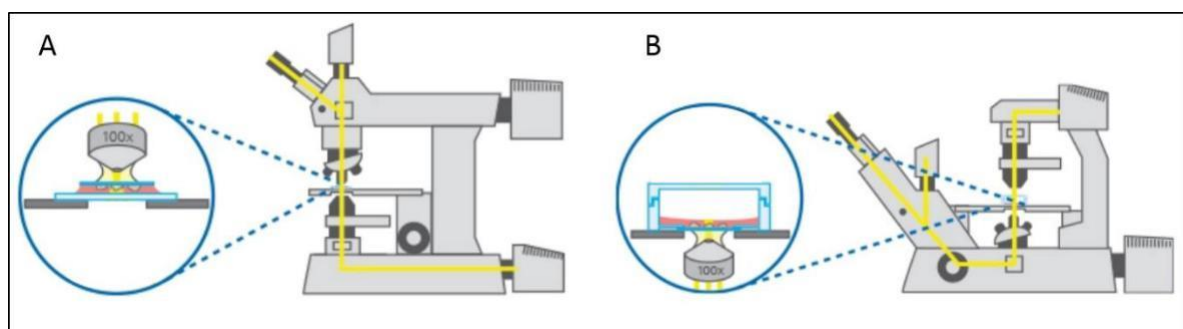


Figure 16 | Configurations classiques en microscopie.

(A) Dans un microscope droit, la lumière d'excitation/l'épi-illumination passe par l'objectif, positionné au-dessus de l'échantillon. (B) Dans un microscope inversé, la lumière d'excitation/l'épi-illumination passe par l'objectif, positionné en dessous de l'échantillon.

Dans un design préliminaire, présenté **Figure 17**, nous faisons le choix de positionner le support de culture contre la face inférieure du dispositif, et d'installer les éléments connectiques sur la face supérieure. En effet, cette configuration :

simplifie la manipulation de la chambre, tous les éléments à visser ou dévisser étant situés sur la même face,

supprime le besoin de dispositifs de suspension, tels qu'observés dans la majorité des prototypes et des systèmes commerciaux (**Figure 5**, **Figure 6**, **Figure 7**),

permet d'utiliser, de disposer et de stocker la chambre à plat sur n'importe quelle surface de travail ;

offre la possibilité de regrouper les chambres en assemblages compacts avec un nombre d'unité variable en fonction des paramètres de l'étude (e.g., chambres en série ou en parallèle) ou des contraintes d'espace (e.g., taille des incubateurs).

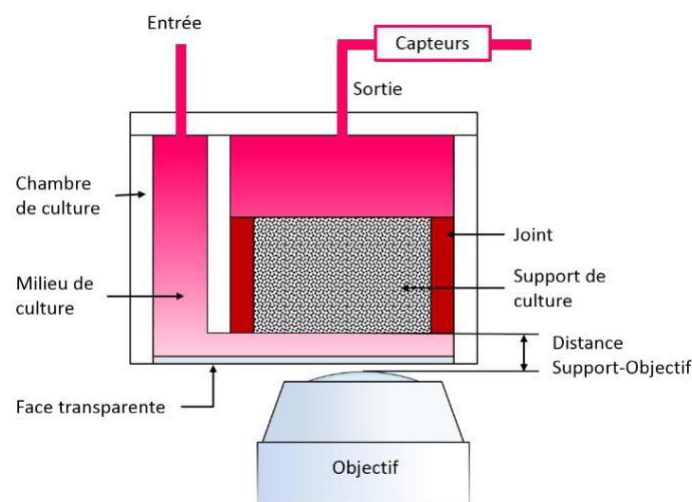


Figure 17 | Design préliminaire de la chambre de culture.

Le milieu traverse la chambre de culture et perfuse par en dessous le support de culture sécurisé par un joint d'étanchéité. Des capteurs placés à la sortie permettent d'analyser les caractéristiques physiques de l'écoulement (débit, pression), ainsi que l'activité chimique des cellules (e.g., consommation d'O₂ et glucose, relargage de cytokines).

Comme illustré **Figure 11**, une condition d'acquisition d'images par techniques de microscopie réside dans la correspondance entre la distance du support de culture à l'objectif et la distance de travail de ce dernier. Cependant, la distance de travail d'un objectif diminue rapidement avec l'augmentation de son grossissement (**Figure 18A**). Pour notre dispositif, la distance entre le support de culture et la face transparente de la chambre nécessaire au passage du milieu de culture (**Figure 17**) semble exclure l'utilisation d'objectifs traditionnels (**Figure 18B**), au profit d'objectifs « Extra-long Working Distance » (ELWD), ou « Super-Long Working Distance » (SLWD), dont les distances de travail en fonction du grossissement sont présentées **Figure 18C**. L'utilisation d'un objectif de grossissement x100 étant favorisée pour l'acquisition d'images à l'échelle cellulaire, il sera donc préférable de dimensionner la chambre de culture de façon à positionner le support de culture le plus près possible de la face inférieure, et impérativement à moins de 4,7 mm pour un objectif SLWD, ou 2 mm pour un ELWD.

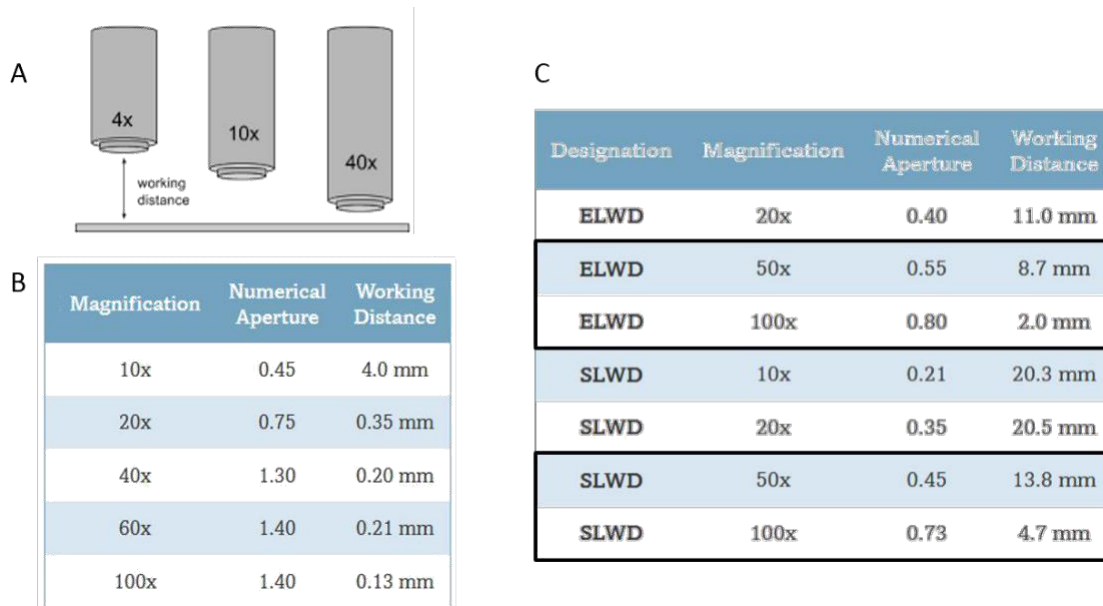


Figure 18 | Distances de travail de différents types d'objectifs de microscope.

(A) Illustration de la diminution de la distance de travail avec l'augmentation du grossissement de l'objectif employé. (B) Distances de travail d'objectifs classiques de microscope de la marque Nikon (Spring 2019). (C) Distances de travail d'objectifs de microscopie Extra-Long Working Distance (ELWD) et Super-Long Working Distance (SLWD) de la marque Nikon (Spring 2019).

Pour faciliter la fabrication et la mise en œuvre des chambres, nous avons orienté leur conception vers un nombre minimal de pièces et d'étapes de fabrication. La chambre de culture est ainsi composée d'un bloc de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) rectangulaire dans lequel sont percés, de la face supérieure vers la face inférieure, deux canaux partiellement filetés pour accueillir le support de culture, l'entrée et la sortie de fluide (**Figure 19**).

Le support de culture est maintenu dans un espace clos et étanche à l'aide d'un joint d'étanchéité placé autour de ce dernier et d'une vis, i.e., le collecteur, lui-même percé pour accueillir la connectique de sortie de fluide (vis bleue, **Figure 19**). Ce joint d'étanchéité peut avoir diverses formes. Un joint d'étanchéité ayant une surface périphérique inclinée permet d'associer le serrage axial du joint contre le collecteur à un serrage radial contre le support de culture, et facilite l'insertion dans le collecteur par rapport à un joint cylindrique (**Figure 19**).

Le perçage traversant permet d'acheminer le milieu de culture de la face supérieure vers la face inférieure de la chambre de culture. Dans un exemple de mise en œuvre, des sillons usinés sur cette face inférieure puis fermés à l'aide d'une plaque en PMMA de qualité optique et de faible épaisseur (e 500 μm) permettent de délimiter des microcanaux qui acheminent le fluide jusqu'au support de culture (face inférieure du support de culture, cf. **Figure 19** « Motif d'alimentation »), tout en préservant la compatibilité de la chambre avec les techniques de microscopie (éloignement faible du support de culture par rapport aux éléments optiques).

Les caractéristiques techniques du réseau fluide en amont (entrée de fluide) et en aval (collecteur, sortie de fluide) du support de culture sont essentielles pour le bon fonctionnement du système dans sa globalité car elles modulent l'environnement fluide au sein du support de culture (cf. Chapitre II.1.2). Ces contraintes de design sont abordées dans le Chapitre suivant II.3.

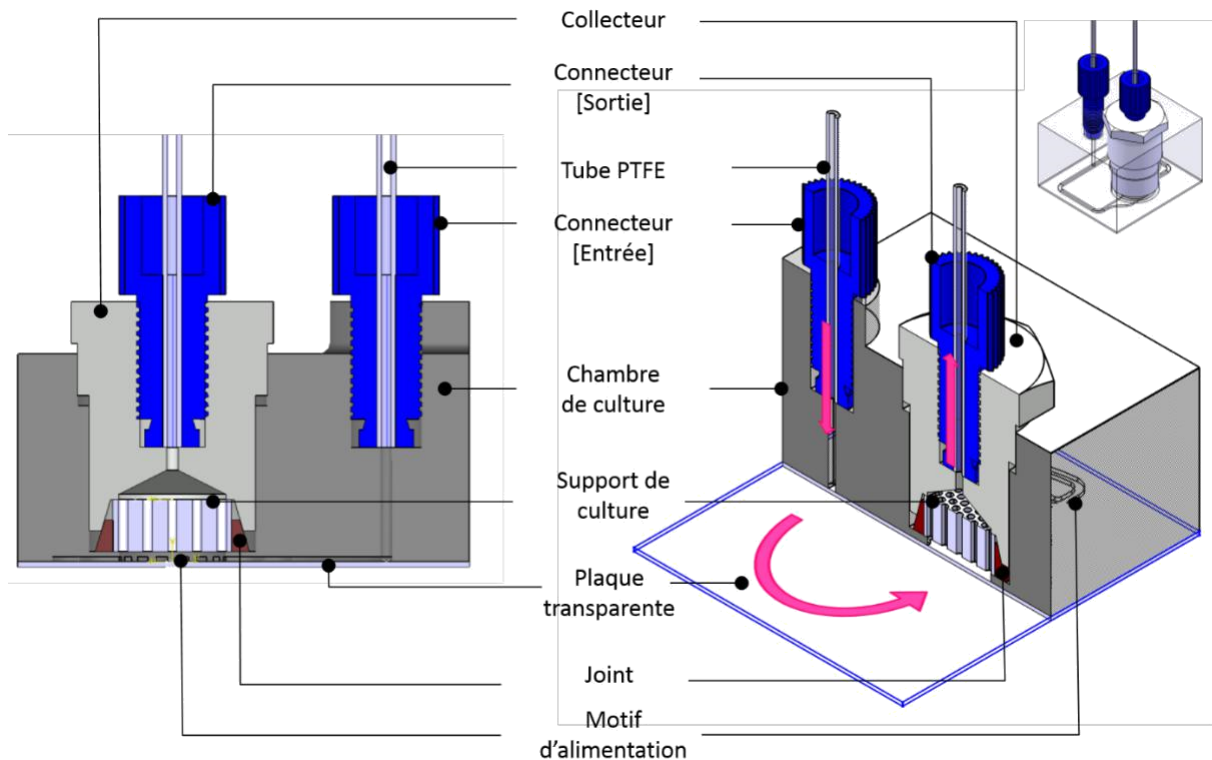


Figure 19 | Schémas en coupe de la chambre de culture (prototype).

Le collecteur est vissé dans la chambre de culture. Les connecteurs d'entrée et de sortie sont vissés respectivement dans la chambre et le collecteur. L'étanchéité entre le support, la chambre et le collecteur est assurée par un joint d'étanchéité conique. L'environnement fluide est maîtrisé via les caractéristiques du « motif d'alimentation » et du « collecteur ».

II.3 Contrôle de l'environnement fluide

Comme énuméré en amont le contrôle de l'environnement fluide au sein du support de culture repose sur le contrôle du débit (cf. Chapitre II.2.1), l'étanchéité et la disposition du joint autour de ce support (cf. Chapitre II.1.2) mais également sur la conception du support de culture et du réseau fluide en amont et en aval de celui-ci.

II.3.1 Choix du design général du support de culture

Comme rappelé et illustré **Figure 20**, les caractéristiques architecturales du support de culture jouent un rôle fondamental dans la définition des vitesses locales de circulation du fluide, les contraintes de cisaillement fluide et donc le devenir et l'activité cellulaire (cf. Chapitre I section 2 de la revue).

Nous développons dans la revue (section 3.2) l'hypothèse que ces paramètres géométriques, et notamment la nature semi-aléatoire des macropores (**Figure 21A**), sont partiellement responsables des faibles degrés de reproductibilité inter-études en ingénierie tissulaire osseuse. Pour contourner cette problématique et simplifier le contrôle de l'environnement chimique et mécanique, nous avons dans un premier temps choisi d'utiliser des supports de culture avec une structure composée de canaux cylindriques traversants de section constante (**Figure 21B**). Cette géométrie a été sélectionnée pour sa capacité à générer des contraintes de cisaillement uniformes sur l'ensemble de la surface de culture, permettant ainsi de contourner le problème d'interprétation des résultats engendrés par la distribution de valeurs associées aux géométries plus complexes (**Figure 21**, et Chapitre I section 4.2

de la revue). Enfin, ces structures permettent une application directe de la loi de Poiseuille-Hagen (cf. Chapitre I section 2.1.2 de la revue, Equation 4 : $\tau = 8\mu v/d$), et autorisent ainsi un ajustement direct de la combinaison des vitesses locales de circulation et des contraintes de cisaillement en modifiant de façon coordonnée le débit de perfusion, la viscosité du milieu de culture et le diamètre des canaux (cf. Chapitre III.1.2, **Figure 46**).

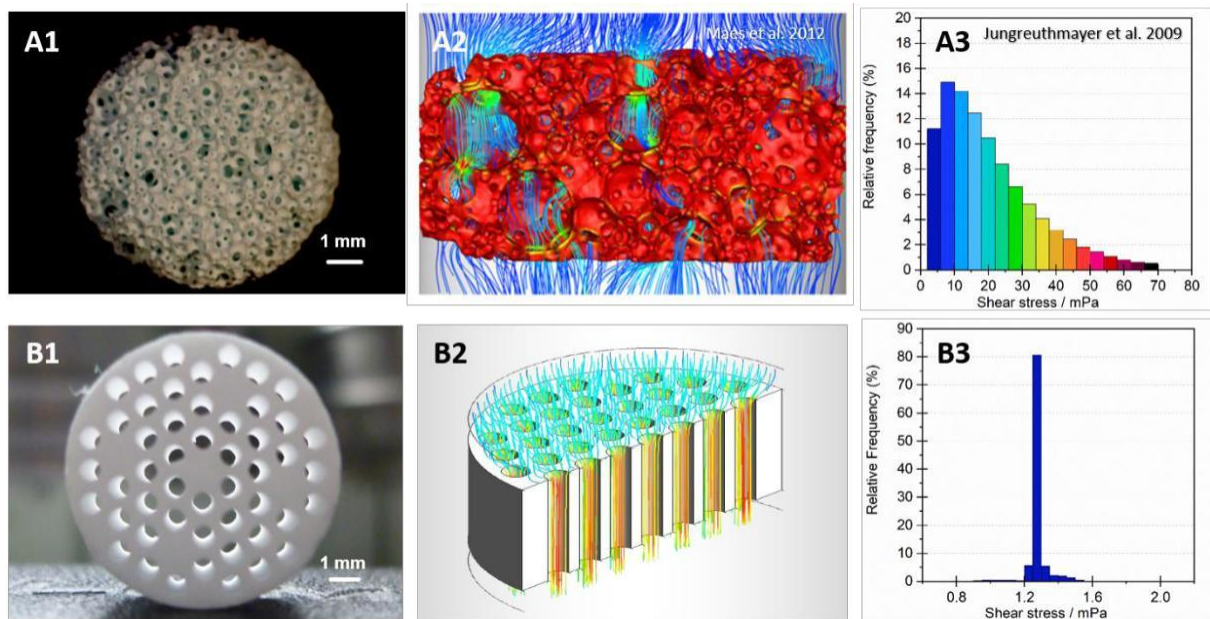
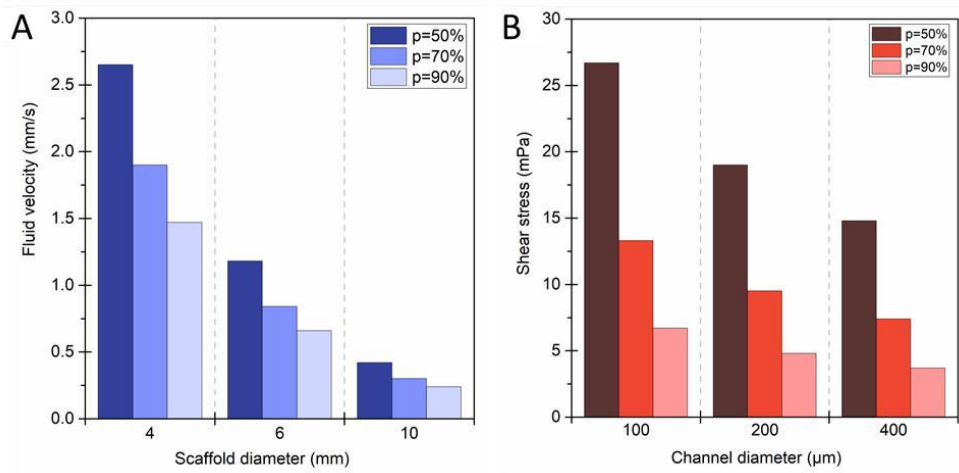


Figure 21 | Choix de l'architecture des supports de culture.

(A) 1 - Photographie d'un support de culture obtenu par « particle-leaching » - 2 - Modélisation des lignes de courant dans un support du même type. Le champ des vitesses est irrégulier et est défini par les défauts du support (Maes et al. 2009). 3 - Distribution des contraintes de cisaillement dans un support du même type (Milan et al. 2009) ; les contraintes de cisaillement s'étalent entre 0 et 80 mPa. (B) 1 - Photographie d'un support de culture traversé de canaux cylindriques uniformes (50 canaux cylindriques de 800 µm de diamètre). 2 - Modélisation des lignes de courant dans un support équivalent (55 canaux cylindriques de 800 µm de diamètre). 3 - Distribution des contraintes de cisaillement simulées à l'aide du logiciel ANSYS Fluent (Canonsburg, Etats-Unis) dans ce dernier ; 90% de la surface de culture est exposée à une contrainte comprise entre 1,2 et 1,3 mPa.

Les modélisations qui vont suivre ont été réalisées pour un support de culture cylindrique de 10 mm de diamètre et 5 mm de haut, traversé de 55 canaux cylindriques de 800 μm de diamètre, placés selon un arrangement hexagonal afin de maximiser le nombre de canaux par support, et donc la surface de culture et la quantité potentielle de tissu osseux formé (**Figure 21B1**). Le diamètre des canaux de 800 μm , plus élevé que les tailles de pores communément trouvés dans la littérature, a été choisi dans le cadre de la thèse de Laura Juignet ([Juignet 2016](#)) et constitue un bon compromis entre confinement et espace disponible pour la croissance de la matrice extracellulaire.

II.3.2. Design et validation numérique du réseau fluide en amont et en aval du support de culture

Le milieu de culture est acheminé de la partie supérieure vers la partie inférieure de la chambre de culture par un « perçage traversant », puis à proximité du support de culture par deux canaux qui constituent le réseau primaire (**Figure 22A**). Ce réseau primaire alimente une nouvelle série de canaux placés juste en amont du support de culture, i.e., sous le support, dans la partie inférieure de la chambre de culture. La conception de ce réseau secondaire, ou « motif d'alimentation » (*cf.* **Figure 22A**), définit la distribution du flux à l'entrée du support de culture. Le milieu sort ensuite du support de culture pour passer à travers le collecteur (*cf.* **Figure 19**). Chacun de ces éléments doit être dimensionné et validé pour assurer l'homogénéité de l'environnement dans le support de culture.

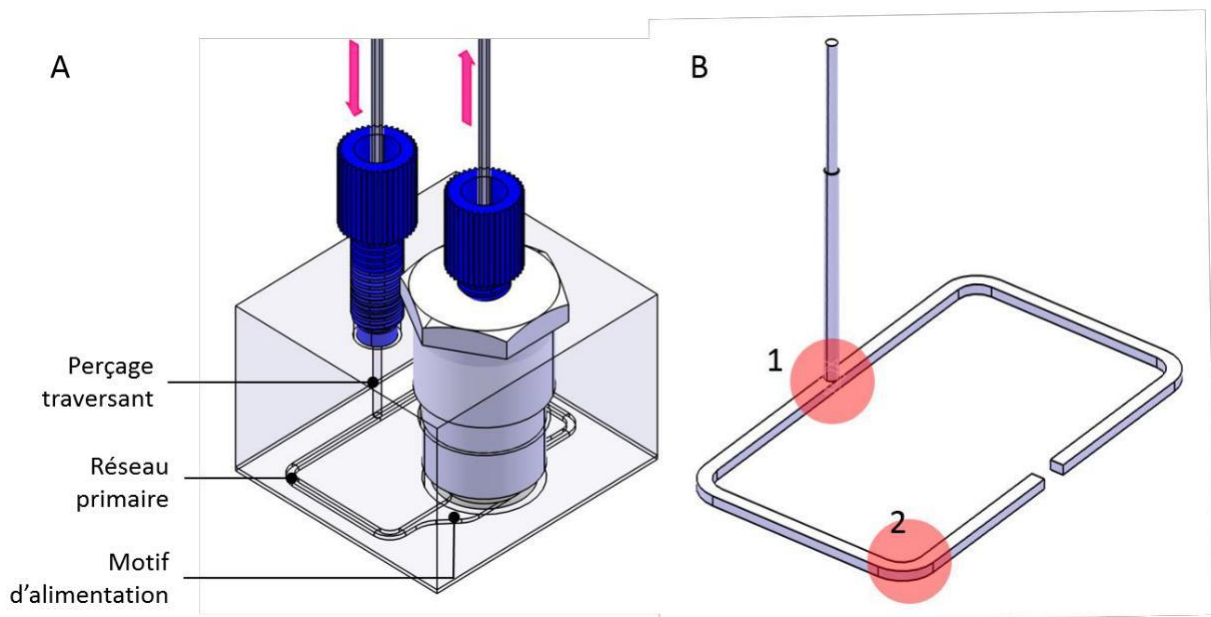


Figure 22 | Zones du circuit fluide à valider en amont du motif d'alimentation.

(A) Nomenclature des différentes sections du circuit fluide, (B) Mise en évidence des coudes hydrauliques du circuit, i.e., (1) la jonction entre le perçage traversant et les canaux du réseau primaire et (2) les « coudes » composants le réseau primaire.

Pour assurer la fiabilité et la pertinence du système sur une large gamme de débits, les validations sont réalisées sur une plage de valeurs (0,3 mL/min, 1 mL/min et 3mL/min) centrée sur 1 mL/min pour sa fréquence élevée d'utilisation dans la littérature.

Les modèles numériques sont réalisés avec les logiciels CATIA V5.2 (DASSAULT SYSTEMES, France) et *Design Modeler* (ANSYS Workbench 17.2, Etats-Unis). Le maillage, la simulation et le post-traitement des cas sont réalisés avec les modules *Meshing*, *Fluent* et *Post* de la suite ANSYS Workbench 17.2

(Canonsburg, Etats-Unis). Les simulations d'écoulement sont réalisées pour un régime laminaire établi, justifié par un nombre de Reynolds inférieur à 1. Les écoulements sont définis par des débits massiques constants de milieu de culture considéré de densité 1 et de viscosité constante de 0,7 mPa.s (Bacabac et al. 2005), et par une pression constante à la sortie du fluide.

II.3.2.1 Distribution et géométrie du réseau primaire

Avant d'être acheminé jusqu'au motif d'alimentation en amont du support de culture (**Figure 22A**), le milieu de culture traverse plusieurs coudes hydrauliques (**Figure 22B**), qui peuvent être à l'origine de dissymétries de distributions des lignes de courant, de surpressions locales et de tourbillons (que nous appellerons « phénomènes parasites »). Une modélisation en amont de la fabrication est donc nécessaire afin de déterminer les caractéristiques géométriques du réseau hydraulique (incluant les coudes) qui définiront les dimensions minimales de la chambre de culture.

Le perçage traversant, d'un diamètre de 1 mm, rejoint en angle droit le réseau usiné sur la face inférieure de la chambre. Les canaux du réseau primaire, délimités entre le bloc et la plaque de PMMA (cf. explication Chapitre II.2.2), ont un profil rectangulaire de 0,5 mm de haut sur 1 mm de large. Les dimensions de ces canaux sont ici contraintes par l'outil d'usinage utilisé.

La zone de jonction entre le perçage traversant et les canaux du réseau primaire définit la répartition du fluide entre les branches gauche et droite du motif d'alimentation du support de culture (le design de ces motifs sera abordé au Chapitre suivant II.3.2.2). La présence de phénomènes parasites pourrait donc avoir un effet significatif sur la distribution du flux dans le support de culture. Une analyse par éléments finis de l'écoulement à cette jonction a été réalisée pour des débits de 0,3 mL/min, 1 mL/min et 3 mL/min (**Figure 23**). Par soucis d'optimisation, le maillage a été séparé en 4 zones distinctes : perçage, intersection, canal gauche et canal droit. Les lignes de courant et les surpressions locales pour la plage de débit utilisée sont visibles **Figure 23**.

Les résultats montrent un comportement stable des lignes de courant et une répartition symétrique des débits sortants au niveau des canaux droit et gauche du réseau primaire sur la plage de débit étudiée. La surpression locale engendrée sur la surface inférieure du canal par l'arrivée du fluide est inférieure à 5 Pa pour le débit le plus élevé, soit une valeur négligeable vis-à-vis des caractéristiques mécaniques du PMMA. Les caractéristiques de la jonction entre le perçage traversant et les canaux du réseau primaire, telles que définies par le procédé de fabrication envisagé, semblent adaptées à l'application et aux paramètres de fonctionnement prévus.

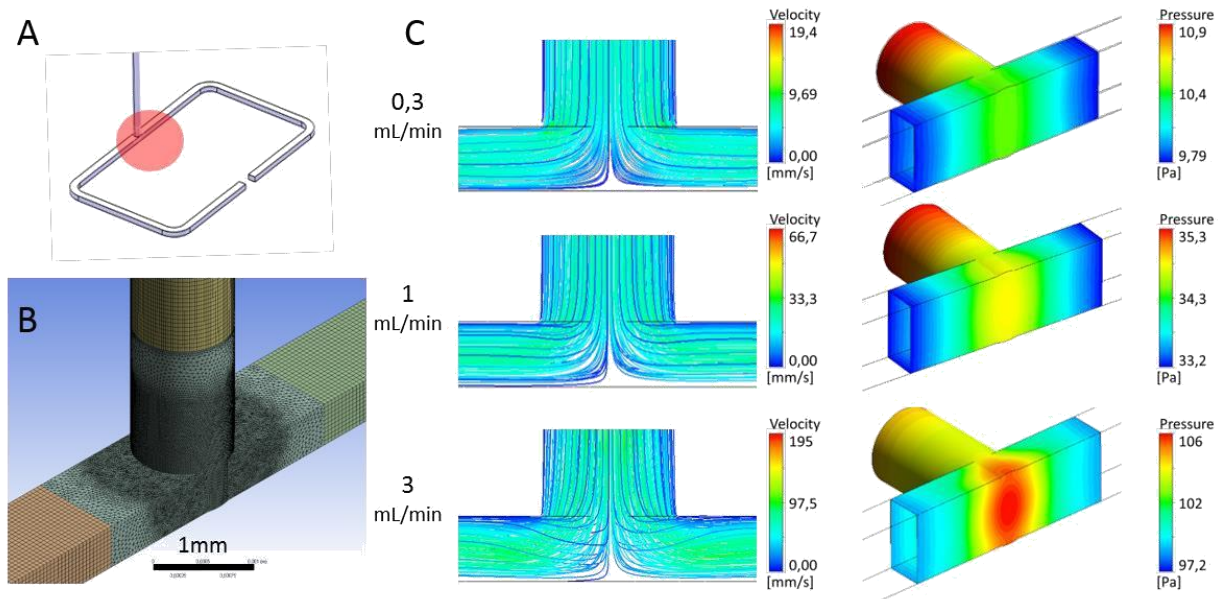


Figure 23 | Validation mécanique *in silico* de la jonction entre le perçage traversant et les canaux du réseau primaire.

(A) Illustration de la zone d'intersection du « perçage traversant » et des canaux du réseau primaire (rond rouge). (B) Maillage de la zone d'intérêt (C) Lignes de courant et pression exercée par le fluide contre la paroi pour des débits de 0,3, 1 et 3 mL/min. Une échelle locale est utilisée pour la représentation de la pression pour mettre en relief l'apparition de la surpression sur la paroi inférieure du canal.

Dans un circuit hydraulique, la présence d'un coude avec un rayon de courbure mal dimensionné par rapport aux caractéristiques de l'écoulement peut entraîner une perturbation du flux et une concentration des lignes de courant sur l'extérieur du virage (**Figure 24**). Nous souhaitons nous assurer de l'homogénéité de l'écoulement en amont du motif d'alimentation. La longueur après laquelle le flux peut à nouveau être considéré homogène dans le canal à la sortie du coude additionnée à la dimension du motif définira les dimensions minimales de la base (longueur*largeur) de la chambre de culture.

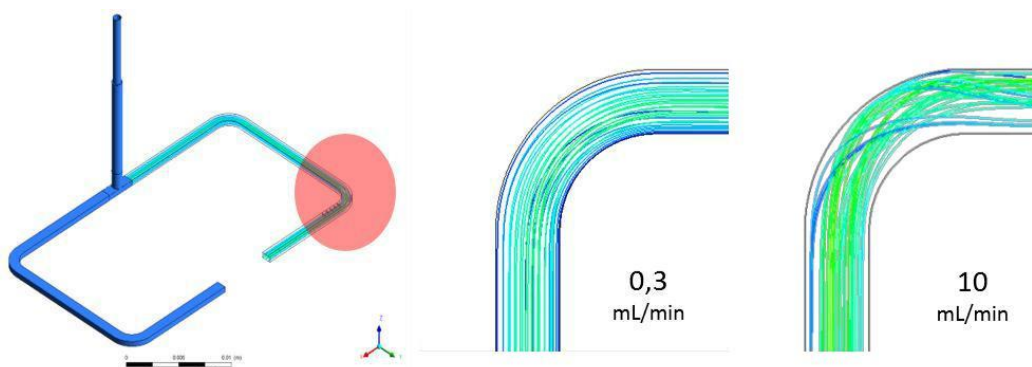


Figure 24 | Répartition de l'écoulement dans un coude d'un rayon de courbure de 2 mm en fonction du débit. Pour un débit de 0,3 mL/min, l'écoulement reste régulier sur l'ensemble du canal. Pour un écoulement de 10 mL/min, les lignes de courant, régulières avant le coude, sont ensuite concentrées contre la paroi extérieure.

Pour mesurer la répartition de débit à l'intérieur du canal en fonction de la distance par rapport à la fin du cintrage du coude, des demi-plans virtuels occupant les moitiés « extérieures » et « intérieures » du canal ont été placés à 0,5 mm d'intervalle à partir de la fin du cintrage (**Figure 25A**) à l'aide du module Post d'ANSYS Workbench 17.2 (Canonsburg, Etats-Unis). La mesure du débit à travers ces demi-plans nous donne la distance nécessaire pour que l'écoulement redevienne homogène au sein du canal. Les données correspondantes sont présentées **Figure 25B**. Pour un débit de 0,3 mL/min,

l'écoulement reste homogène sur l'ensemble du canal (données non représentées). Pour des débits de 1 et 3 mL/min, l'écoulement peut être considéré comme homogène respectivement à environ 0,5 mm et 2 mm après la fin du cintrage du coude. Une longueur de 2 mm de canal n'est quant à elle pas suffisante pour permettre l'homogénéisation de l'écoulement pour un débit de 10 mL/min.

Un réseau primaire formé sur cette base de canaux de profil rectangulaire de 0,5 mm de haut, 1 mm de large et plus de 2 mm de longueur associé à des coudes à 90° semble donc adapté aux applications envisagées sur la gamme de débit considéré (Q 3 mL/min)

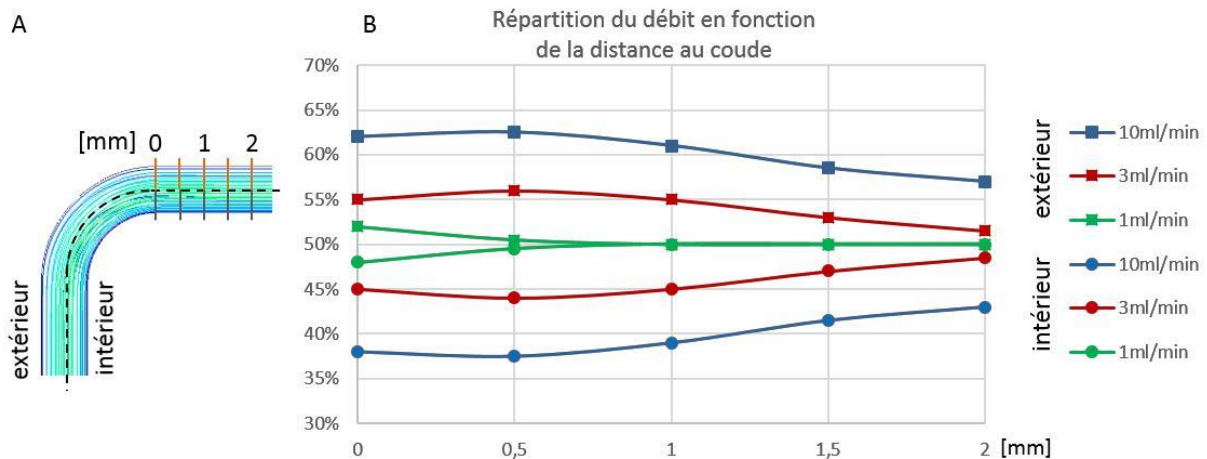


Figure 25 | Répartition du débit dans le canal en fonction de la distance par rapport à la fin du cintrage du coude.

(A) Demi-plans placés de part et d'autre du canal à intervalles réguliers de 0,5 mm (ANSYS Workbench FLUENT, Canonsburg, Etats-Unis), (B) Mesure du débit à travers des demi-plans virtuels occupant les moitiés extérieures et intérieures du canal, exprimé en pourcentage du débit sortant total. L'écoulement est considéré homogène lorsque les débits traversant chaque de mi-plan convergent vers 50%.

II.3.2.2. Distribution et géométrie du motif d'alimentation

L'acquisition d'images par des techniques de microscopie nécessite que le chemin optique entre le support de culture et la plaque de fond soit dégagé, et que l'épaisseur de milieu entre ces deux éléments soit faible devant la distance de travail de l'objectif utilisé (cf. **Figure 11** et **Figure 17**). Ces contraintes compromettent cependant l'homogénéité du champ des vitesses à l'abord du support de culture, d'où la nécessité de concevoir un motif d'alimentation permettant de rétablir une distribution homogène de ce champ malgré l'espace restreint. Deux grands types de conception ont été étudiés pour ces motifs d'alimentation :

le premier s'appuie sur le fonctionnement des « parallel-plate flow chambers » (PPFC, **Figure 26A**, image de gauche), communément utilisées en ingénierie tissulaire osseuse (cf. Chapitre I section 4.1.2 de la revue) pour leur capacité à générer un environnement mécanique et un profil de vitesse

homogène sur une zone toutefois bornée de la surface de culture (**Figure 26B**, image de gauche). Le second design s'inspire des puces microfluidiques (**Figure 26A**, image de droite). Ces dispositifs sont basés sur des arrangements de microcanaux permettant un contrôle robuste de l'environnement fluide à la sortie de ces derniers (**Figure 26B**, image de droite). Ils offrent ainsi la possibilité de réaliser de nombreuses opérations de mélange (Mahadik et al. 2014; Ward and Fan 2015), séparation (Ferraro et al. 2018), ou encore encapsulation (Headen et al. 2018) dans des domaines aussi variés que la chimie ou la biologie.

Sur la base de ces deux designs, la **Figure 26C** présente des exemples de motifs usinés sur la face inférieure de nos chambres de culture (CATIA V5.1., Dassault Systems, France).

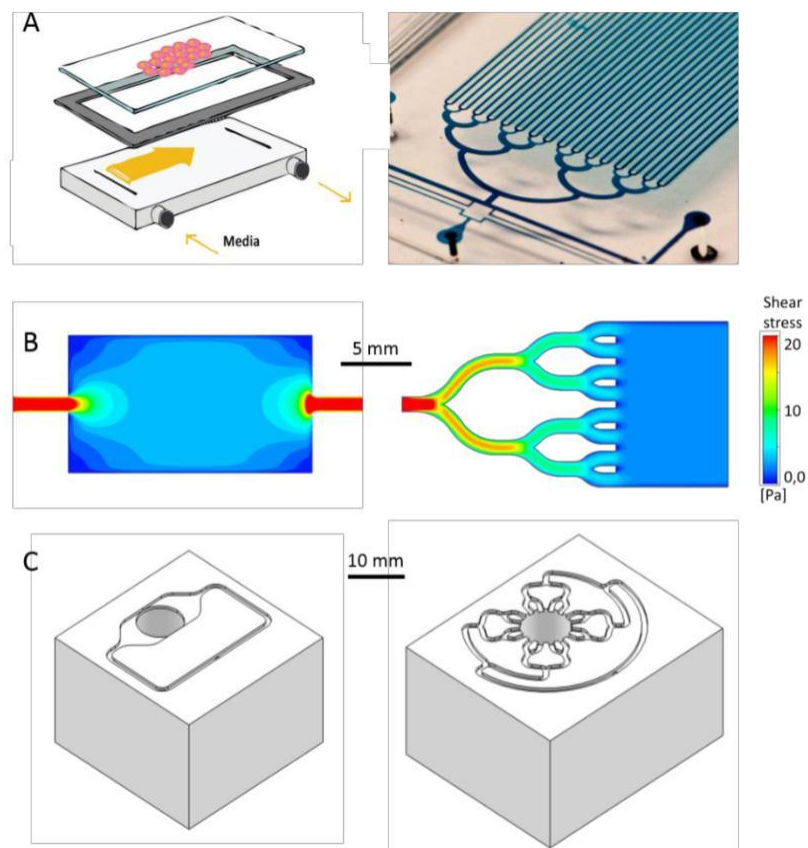


Figure 26 | Présentation des designs inspirés des PPFC et des puces microfluidique.

(A) Présentation des dispositifs originaux. À gauche, un schéma de structure d'une PPFC (Cooper et al. 2012). À droite, une puce microfluidique dédiée à la distribution homogène d'un écoulement à travers une multitude de canaux (extremtech).

(B) Cisaillement fluide sur la face inférieure de dispositifs de structure similaire, démontrant leur aptitude à générer un environnement fluide homogène. Les images ont été obtenues sur le logiciel Fluent pour un débit de 1 mL/min (ANSYS Workbench FLUENT, Canonsburg, Etats-Unis).

(C) Adaptation des designs au motif d'alimentation de la chambre de culture (CATIA V5.1., Dassault Systems, France). Pour rappel, les microcanaux sont usinés sur la face inférieure de la pièce et refermés à l'aide d'une vitre en PMMA.

Plusieurs modèles de motifs ont été développés à partir des principes PPFC, microfluidique ou d'une combinaison des deux concepts. Quelques exemples sont donnés **Figure 27**.

L'étude de l'influence du débit sur la configuration des lignes de courant et la répartition des contraintes de cisaillement au sein du support de culture présentée ci-après se limite aux designs : PPFC (**Figure 26C**, image de gauche), microfluidique (**Figure 26C**, image de droite), et « mixte », représenté sur la **Figure 27C**.

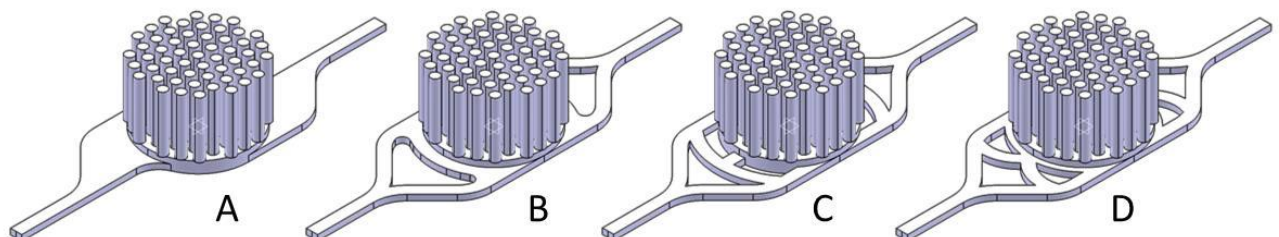


Figure 27 | Exemples de motifs d'alimentation conçus sur la base des principes PPFC et microfluidique.

Les canaux verticaux représentent les 55 canaux de 800 µm de diamètre du support de culture.

La Figure 28 présente les lignes de courant simulées dans ces 3 designs pour 3 débits (0,3 mL/min, 1 mL/min, 3 mL) centrés sur la valeur de 1 mL/min pour sa fréquence d'utilisation dans la littérature (cf. Chapitre I section 3 de la revue). Le logiciel et les paramètres utilisés pour les simulations ont été définis en introduction du Chapitre II.3.2.

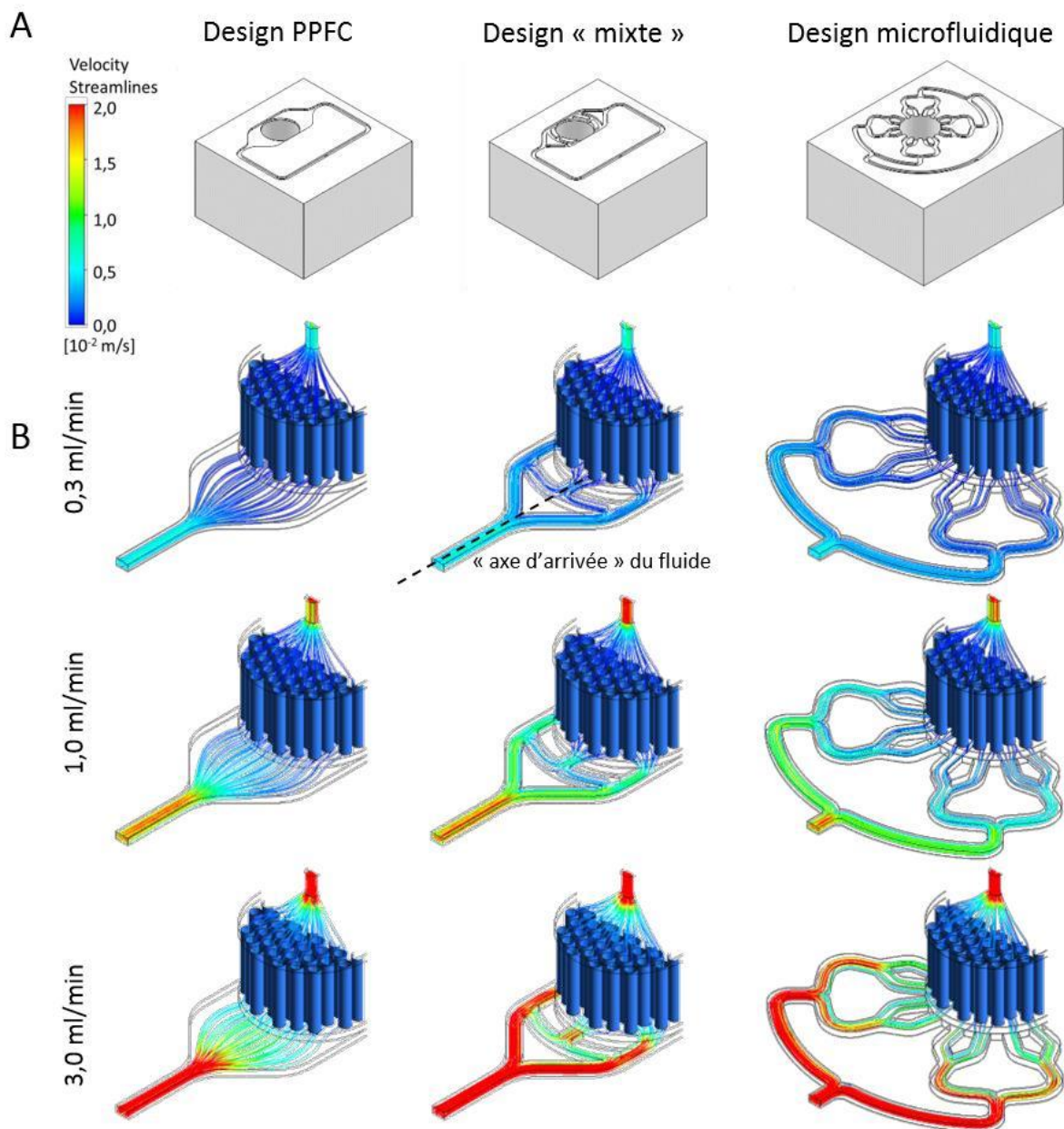


Figure 28 | Modélisation des lignes de courant de l'écoulement pour différents designs du motif d'alimentation.

(A) Visualisation des motifs usinés sur la face inférieure des chambres de culture correspondant respectivement aux designs PPFC, mixte et microfluidique (CATIA V5.1., Dassault Systems, France). (B) Lignes de courant à travers le motif et les canaux

du support de culture pour 3 designs (PPFC, « hybride », et microfluidique à 16 entrées), et 3 valeurs de débit 0,3, 1, et 3 mL/min (collecteur de paramètres $\alpha=30^\circ$ et $h=0,5\text{mm}$, cf. Chapitre II.3.2.3). Les points de départ de 50 lignes de courant sont distribués de façon régulière sur la face d'entrée du fluide. Les lignes de courant sont présentées dans la moitié gauche du motif afin d'améliorer la lisibilité de la figure (ANSYS Workbench FLUENT, Ca nonsburg, Etats-Unis).

L'absence de tourbillons et la stabilité générale du comportement des lignes de courant sont validées sur la gamme de débits étudiés pour les 3 designs présentés. Ces écoulements sont caractérisés par une homogénéité de répartition des lignes de courant, à l'exception du design mixte, pour lequel

l'augmentation du débit semble favoriser l'écoulement par les passages latéraux aux dépens du passage central (i.e., axe d'arrivée du fluide du réseau primaire).

La répartition du flux à travers les canaux cylindriques du support de culture définit la distribution des contraintes de cisaillement qui sont présentées **Figure 29** et **Figure 30**.

Le premier design (PPFC) génère une distribution de valeurs de cisaillement de +/- 10% autour de la valeur moyenne pour les trois débits étudiés. Les rangées de canaux placés dans l'axe d'arrivée du fluide (du réseau primaire) présentent les contraintes de cisaillement les plus importantes (+ 10%) au détriment des canaux latéraux (**Figure 29**, images de gauche). Le profil de la distribution de ces contraintes reste stable sur la plage de débits étudiés (**Figure 30**).

Le second design (« mixte ») génère une distribution de -3/+3% par rapport à la valeur moyenne pour les débits de 0,3 et 1 mL/min, et de - 8/+ 8% pour un débit de 3 mL/min. Les valeurs maximales de cisaillement sont observées dans les canaux latéraux. Le profil de la distribution des contraintes est stable entre 0,3 et 1 mL/min, et varie significativement pour un débit de 3 mL/min (**Figure 30**).

Le design « microfluidique » génère une distribution de valeurs de cisaillement de +/- 2% autour de la valeur moyenne et garde un profil stable pour les trois débits étudiés.

Le design du motif d'alimentation type PPFC, bien que sommaire, présente un comportement constant sur la plage de débits étudiée et une amplitude des distributions des valeurs de cisaillement (+/- 10%) bien inférieure à celles communément trouvées dans la littérature, souvent réparties sur plusieurs ordres de grandeur (voir Chapitre I, section 4.2.2 de la revue). Un tel comportement pourrait suffire pour l'application visée. Toutefois, les contraintes de cisaillement impactant la vitesse de dépôt de matrice extracellulaire et les canaux n'étant pas reliés entre eux, une distribution de contraintes de cet ordre de grandeur (+/- 10%) pourrait provoquer des différences de vitesse de fermeture des canaux en fonction de leur position. Pour des cultures de plusieurs semaines, ces différences risqueraient par effet cascade de modifier significativement et de façon incontrôlable la répartition de l'écoulement et donc l'environnement chimique et mécanique au sein du support de culture. Une distribution la plus étroite possible des valeurs de cisaillement maximiserait donc les chances de maintenir un environnement homogène au sein des supports de culture.

Pour des débits de 0,3 et 1 mL/min, le design « mixte » offre une distribution significativement plus resserrée (+/-3%) centrée sur un pic de valeur étroit (**Figure 30**). Néanmoins, le changement de comportement de ce design pour un débit de 3 mL/min entraîne une surcharge sur les canaux latéraux au détriment des rangées « centrales » (**Figure 28, Figure 29**), restreignant la pertinence de ce design à Q 1 mL/min.

La distribution de contraintes de cisaillement extrêmement resserrée (+/-2%) et la stabilité de ce comportement sur toute la gamme de débits étudiés (**Figure 28, Figure 29, Figure 30**) font du design « microfluidique » le design le plus adapté au contrôle prolongé de l'environnement fluidique.

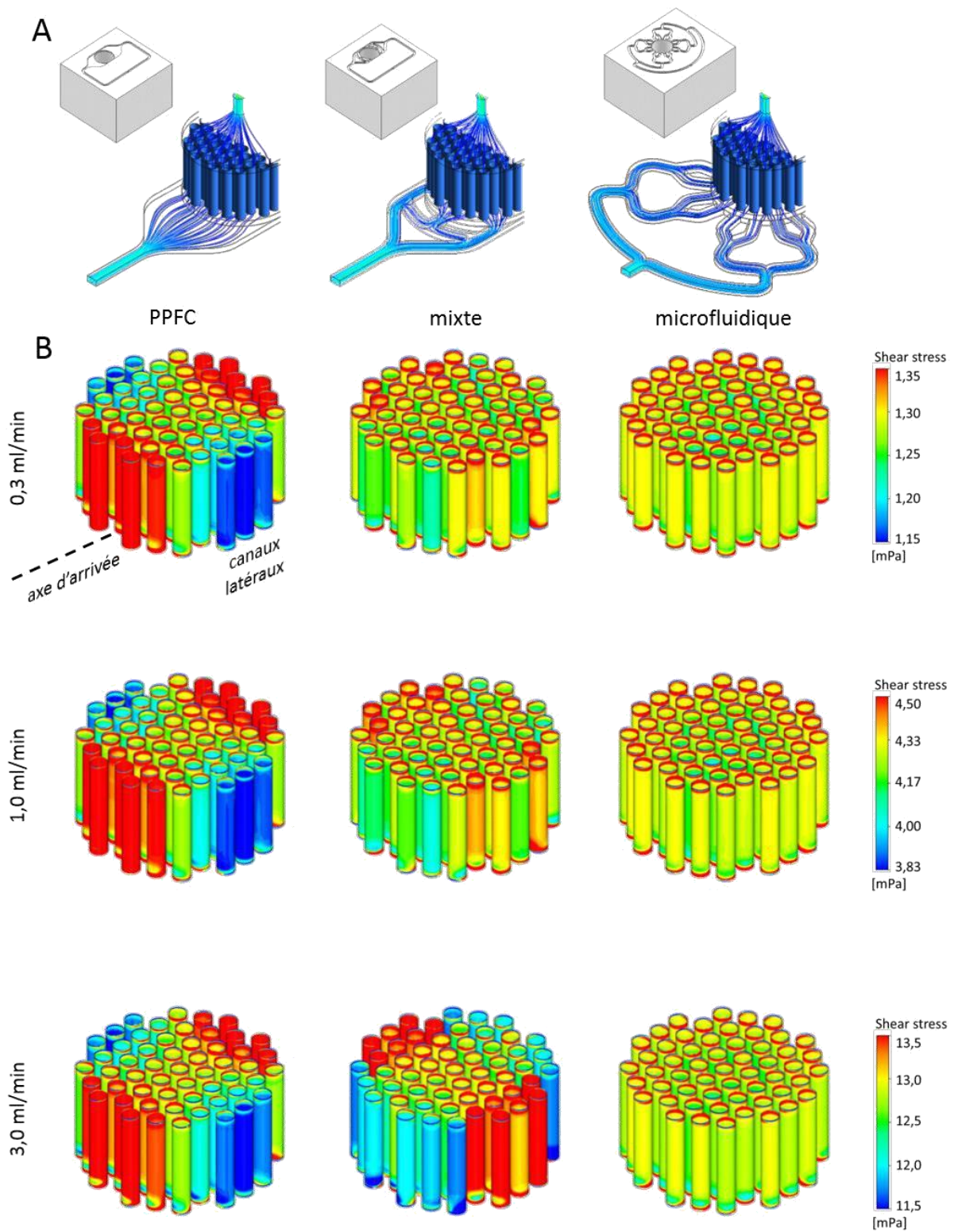


Figure 29 | Contraintes de cisaillement dans les canaux du support de culture en fonction du débit et du design du motif d'alimentation.

(A) Design des motifs usinés et lignes de courant correspondantes pour un débit de 0,3 mL/min et un collecteur de paramètres $\alpha=30^\circ$ et $h=0,5\text{mm}$ (cf. Chapitre II.3.2.3). (B) simulation des contraintes de cisaillement à la surface des canaux dans le support de culture pour 3 débits (0,3, 1 et 3 mL/min) et 3 motifs (PPFC, mixte et microfluidique). L'échelle de la légende est conservée entre les designs (ANSYS Workbench FLUENT, Canonsburg, Etats-Unis).

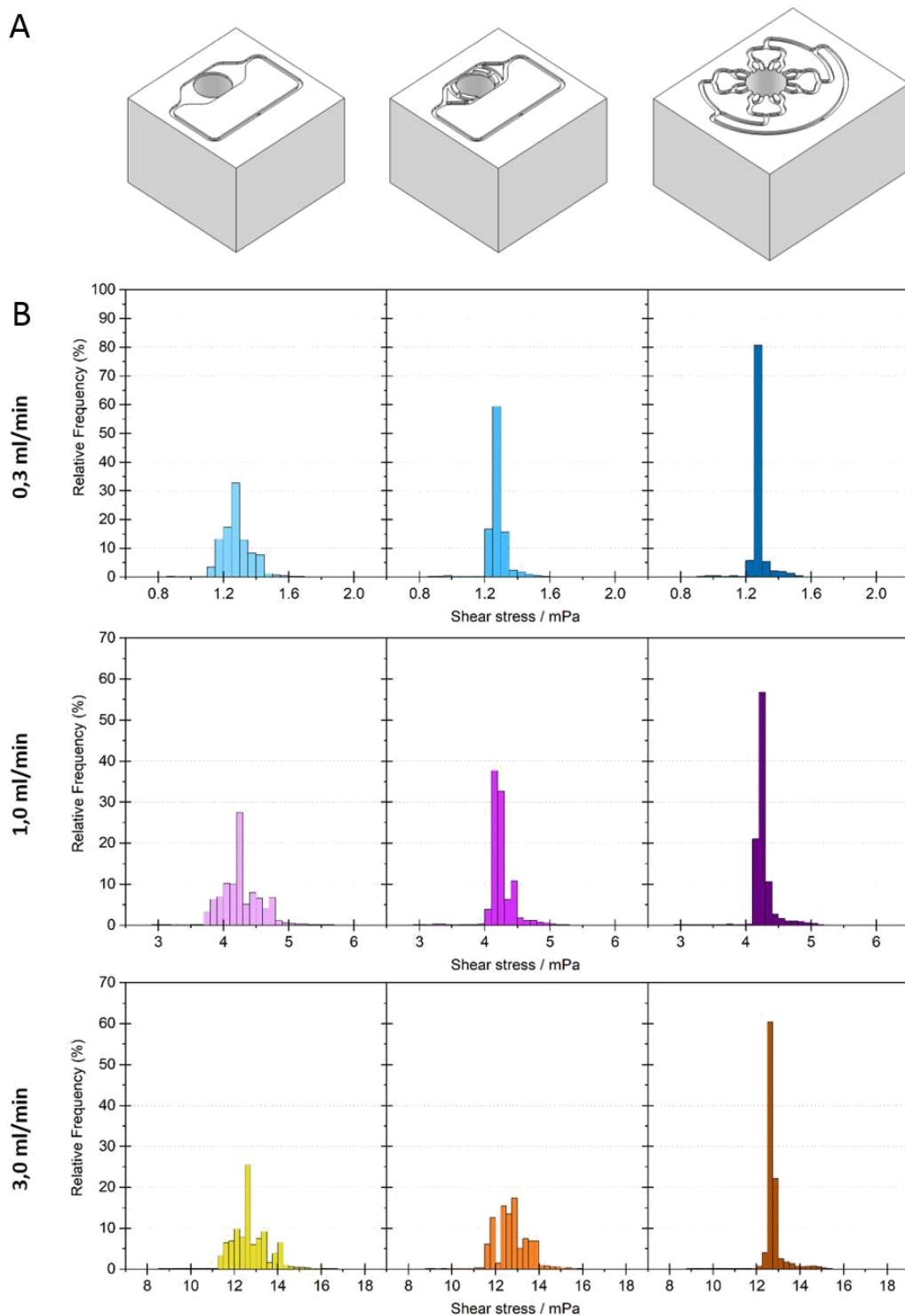


Figure 30 | Distribution des contraintes de cisaillement sur l'ensemble de la surface de culture.
 (A) Visualisation des motifs usinés sur la face inférieure des chambres de culture correspondant respectivement aux designs PPFC, mixte et microfluidique (CATIA V5.1., Dassault Systems, France). (B) Histogrammes représentant la fréquence relative de différents niveaux de contraintes de cisaillement dans les canaux du support de culture pour un collecteur de paramètres $\alpha=30^\circ$ et $h=0,5\text{mm}$ (cf. Chapitre II.3.2.3). Ces valeurs ont été déterminées à l'aide de l'outil d'analyse statistique du logiciel OriginPro 2018b (Northampton, Etats-Unis) sur la base des données extraites des valeurs de cisaillement aux nœuds du maillage de la surface des canaux de la Figure 28.

II.3.2.3 Design et validation numérique de la géométrie du collecteur

Les distributions de cisaillement présentées Chapitre précédent II.3.2.2 sont influencées par la présence du collecteur (cf. **Figure 19**). En l'absence de cette pièce, les canaux périphériques, i.e., les plus proches des faces d'entrée de fluide, constituent un chemin préférentiel d'écoulement (cf. Chapitre I section 4.3.3 de la revue), comme illustré **Figure 31A**. Le design microfluidique génère alors une distribution radiale de l'écoulement (**Figure 31B**), compromettant l'homogénéité de l'environnement fluide dans le support de culture. Un dimensionnement approprié du collecteur est donc essentiel au contrôle de l'environnement.

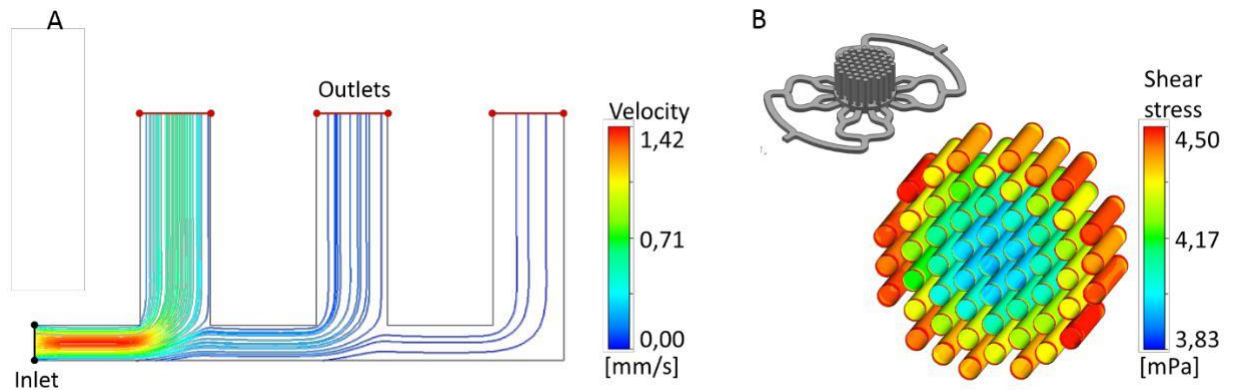


Figure 31 | Distribution des lignes de courant et des contraintes de cisaillement en l'absence de collecteur.

(A) Illustration 2D simplifiée de la distribution de 50 lignes de courant entre une entrée et trois sorties pour un débit entrant défini par une vitesse de 1 mm/s (ANSYS FLUENT, Canonsburg, Etats-Unis). (B) Modélisation des contraintes de cisaillement dans le support de culture pour le design microfluidique pour un débit entrant de 1 mL/min en l'absence de collecteur.

Un collecteur de géométrie interne conique présente l'avantage de faciliter à la fois la réalisation de la pièce, alors fabricable par un procédé de tournage traditionnel, et la modulation de l'environnement par l'introduction de paramètres géométriques simples tels que l'angle du cône (α) et la distance entre la base du cône et le support de culture (h) (**Figure 32A**). L'influence de ces paramètres sur la répartition de l'écoulement est illustrée **Figure 32B, C, D** sur la base de la géométrie 2D présentée **Figure 31A**. Le positionnement de la sortie du fluide à l'opposé de l'entrée permet de rééquilibrer la répartition de l'écoulement entre les canaux périphériques et les canaux en regard de l'orifice de sortie ; la hauteur h définissant la résistance fluide des chemins d'écoulement ainsi créés (**Figure 32B**). L'introduction d'un angle α permet de moduler la résistance du chemin d'écoulement des différents canaux en fonction de leur distance par rapport à l'entrée du fluide (**Figure 32C**). La combinaison adéquate de ces deux paramètres permet d'aboutir à une répartition homogène de l'écoulement entre les différents canaux (**Figure 32D**). L'étude paramétrique réalisée sur le collecteur pour déterminer cette combinaison est présentée **Figure 33**. Des angles α de 60° et 45° ne permettent pas une augmentation suffisante de la résistance du chemin d'écoulement pour les canaux périphériques, résultant systématiquement en une distribution décroissante des contraintes de cisaillement de la périphérie vers le centre du support, à l'exception de la combinaison $\alpha = 45^\circ$ et $h = 0$ mm qui entraîne une réduction significative de cette distribution. Un angle α de 30° combiné à une valeur de h nulle pénalise excessivement l'écoulement dans les canaux périphériques, menant à une distribution cette fois-ci croissante de la périphérie vers le centre du support. La distribution la plus homogène est obtenue pour la combinaison $\alpha = 30^\circ$ et $h = 0,5$ mm.

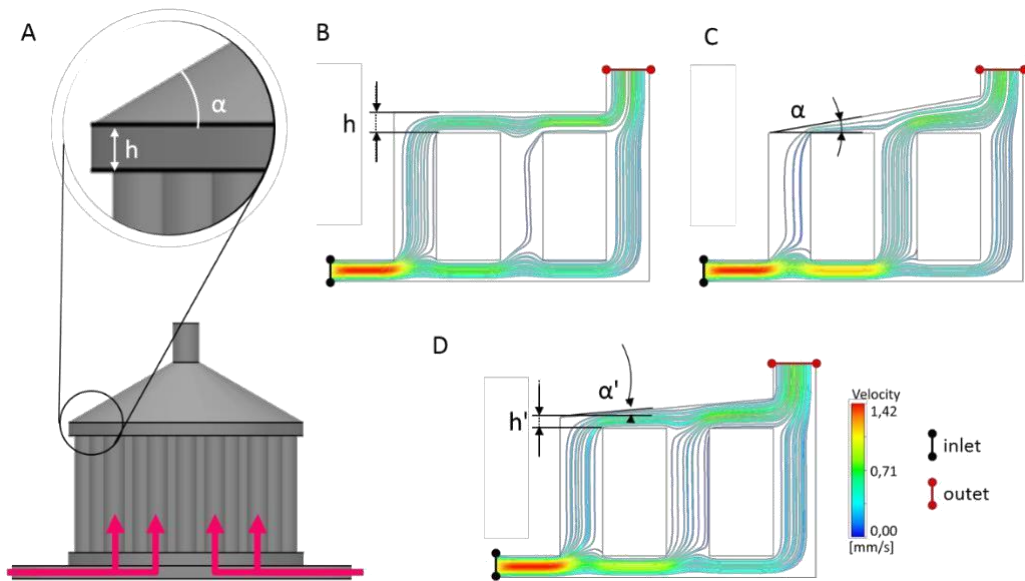


Figure 32 | Influence des paramètres géométriques du collecteur sur l'écoulement.

(A) Les paramètres géométriques du collecteur étudiés ici sont la distance h entre la sortie des canaux du support et le cône du collecteur, et l'angle α entre la paroi du cône et l'horizontale. Les flèches roses représentent le sens de perfusion du milieu de culture. (B) La distance h influence la résistance du chemin d'écoulement en aval du support de culture. (C) L'angle α introduit une variabilité de la résistance du chemin d'écoulement en fonction de la position du canal dans le support. (D) La combinaison appropriée de ces deux paramètres permet d'aboutir à une répartition homogène de l'écoulement.

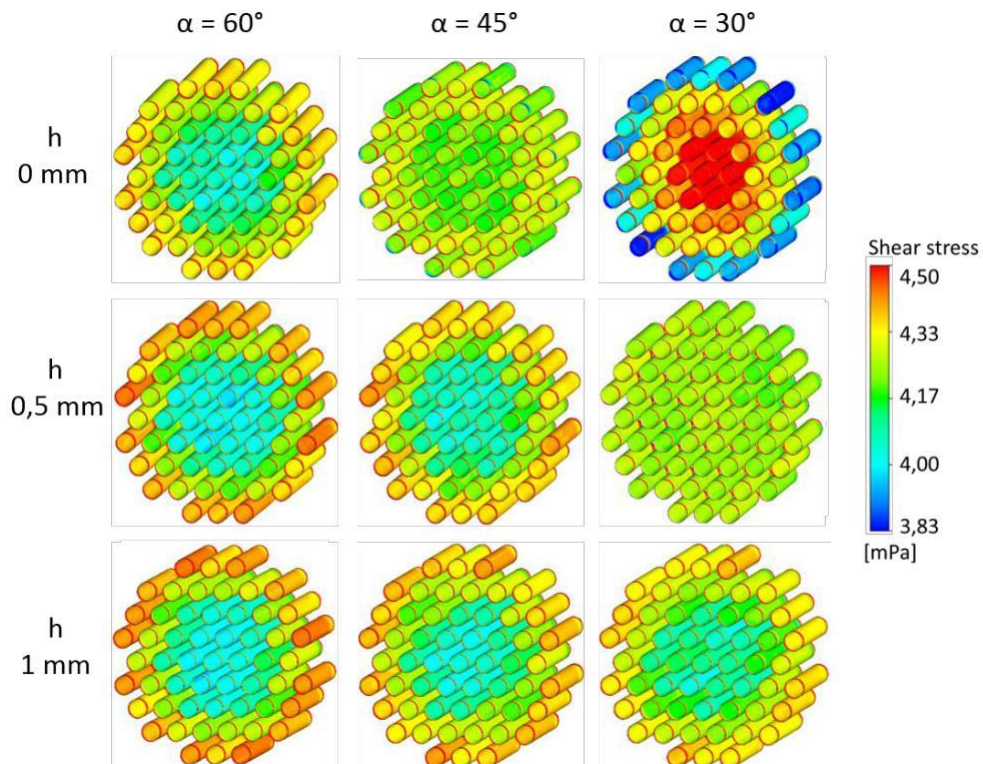


Figure 33 | Influence des paramètres α et h du collecteur sur la distribution de τ dans le support de culture. Ces simulations ont été réalisées avec le motif d'alimentation type « microfluidique » (cf. Figure 28) et un débit de 1 mL/min. La distribution la plus homogène est obtenue pour une combinaison d'un angle α de 30° et d'une distance h de 0,5 mm.

II.4 Automatisation

Comme discuté dans le Chapitre I, notamment section 5.2.2 de la revue, les différences de protocole et de manipulation inter-équipes et inter-opérateurs présentent une source de variabilité majeure. Les résultats d'une étude seront notamment systématiquement conditionnés par la qualité de la phase d'ensemencement (Bouet et al. 2015b; Kurzyk et al. 2019; Langhans 2018; Levin et al. 2018). Les interruptions de perfusion, souvent nécessaire pour la réalisation de procédures de routine comme le changement du milieu de culture, peuvent également générer un stress cellulaire du fait d'une variation brutale de l'environnement physico-chimique. L'absence de contrôle des échanges gazeux entraîne également des variations importantes de la concentration du milieu de culture en dioxygène en fonction des dispositifs, malgré l'impact connu de ce paramètre et les avantages présentés par un environnement physioxique ((Moya 2016; Spencer et al. 2014b), Chapitre I section 4.4.2.2 de la revue). Le développement de l'automatisation des systèmes de cultures permettrait donc une amélioration conséquente de la qualité et de la maîtrise de l'environnement des cultures cellulaires.

À l'instar de l'importance du contrôle de l'environnement, nous présentons également dans le Chapitre I section 5.2.2 de la revue le rôle clé de l'automatisation et de l'adaptation des dispositifs culture et de leurs fonctions dans le développement de l'ingénierie tissulaire osseuse. Les mises en application de l'ingénierie tissulaire osseuse dans des cadres cliniques et industriels ainsi que la réalisation des études paramétriques complexes nécessaires au développement de nouveaux standards méthodologiques nécessitent une mise à l'échelle supérieure des dispositifs de culture existants (Yeatts and Fisher 2011). L'accessibilité de cette mise à l'échelle en termes de charge de travail dépend néanmoins du degré d'automatisation des dispositifs employés. Nous avançons qu'un système de culture adapté aux applications précitées doit présenter la possibilité d'une automatisation au moins partielle des fonctions clés listées ci-dessous :

L'ensemencement

- La gestion des paramètres de perfusion
- Le changement de milieu

- Le prélèvement d'échantillons de milieu de culture
- L'injection programmée de substances

- Le relevé des informations enregistrées par les capteurs

En partenariat avec Elveflow[®], entreprise spécialisée dans les systèmes de contrôle des écoulements microfluidiques, nous avons mis au point un circuit hydraulique modulaire et programmable sur la base d'une association d'électrovalves dont la configuration est rappelée **Figure 34A**. La circulation unidirectionnelle et ininterrompue de milieu de culture, fonction de base de la majorité de dispositifs perfusés, est assurée par l'activation synchronisée des électrovalves EV1, EV2 et EV3, représentées **Figure 34B**. Le sens de circulation du milieu de culture au sein de la chambre est réversible à tout moment par l'activation isolée de la valve EV1.

Les changements de milieu, prélèvements d'échantillons et ajouts de substances sont rendus possibles sans interruption ou perturbation de l'environnement fluide par la procédure décrite **Figure 34C**. L'électrovalve EV4, positionnée en aval de la chambre de culture et des capteurs, permet de détourner l'écoulement vers un réservoir vide (R3), soit brièvement pour réaliser un prélèvement d'échantillon de milieu, soit jusqu'à la vidange complète du réservoir pressurisé. Dans cette configuration, le réservoir alors isolé (R2 dans la **Figure 34C1**) peut être changé par un réservoir de milieu de culture

frais, additionné si nécessaire de la ou des substances à étudier (e.g., irisine - cf. Chapitre III.2 projet ESA MAP BONUS). L'activation synchronisée des valves EV1, EV2, EV3 et EV4 permet ensuite le retour à la configuration de perfusion d'origine.

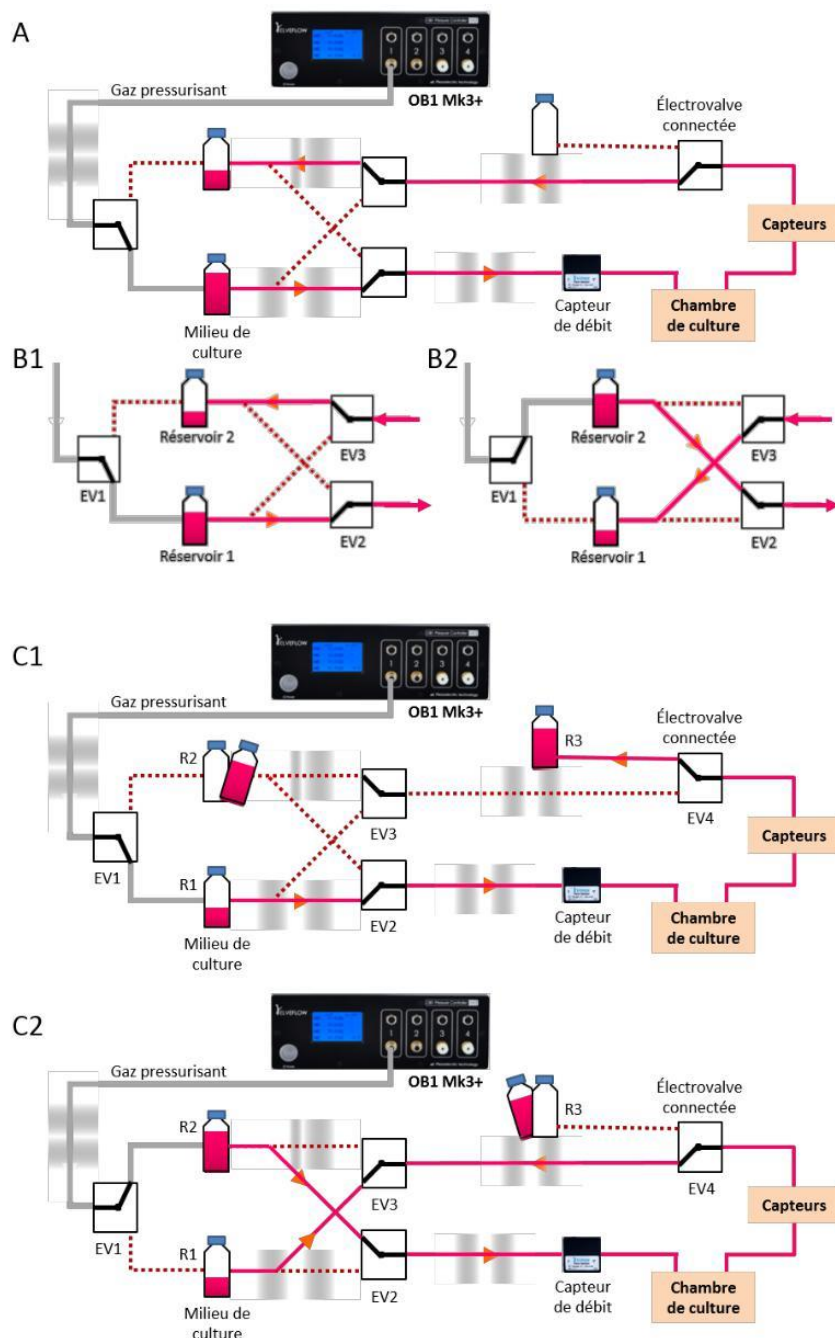


Figure 34 | Exemples de fonctions clés du montage hydraulique.

(A) Le circuit hydraulique de base est composé d'une unité de pressurisation OB1 Mk3+, de 4 électrovalves 3:2 programmables, de 3 contenants, d'un capteur de débit permettant la régulation de la consigne de perfusion, de la chambre de culture et d'une sélection de capteurs variables en fonction des besoins expérimentaux. (B) Le basculement simultané des valves EV1, EV2 et EV3 permet la recirculation continue du milieu de culture sans modification du sens de perfusion au sein de la chambre de culture. (C) 1 – Le basculement de la valve EV4 permet la vidange du contenant R1 dans le contenant R3. Le contenant R2 peut ainsi être remplacé par un réservoir de milieu de culture frais sans perturbation de la circulation. 2- Le basculement simultané des valves EV1, EV2, EV3 et EV4 permet la reprise du cycle de circulation et le prélèvement du contenu du réservoir R3.

L'interface logicielle d'Elveflow permettant la programmation simultanée de l'unité de pressurisation et de l'ensemble des composants connectés, le circuit présenté Figure 34 permet donc la mise en place de protocoles pour l'ensemble des fonctions énumérées en supprimant les risques de variation environnementale non désirées en minimisant les interventions humaines.

Ce montage présente également l'avantage d'être aisément adaptable à différents besoins expérimentaux. L'unité OB1 Mk3+ présente notamment quatre canaux de pressurisation programmables indépendamment, permettant la multiplication rapide du nombre d'expériences réalisables en parallèle. De plus, le remplacement des électrovalves 3:2 par des composants plus complexes (Figure 35), permet de réaliser plusieurs changements et prélèvements de milieu consécutifs sans intervention humaine.

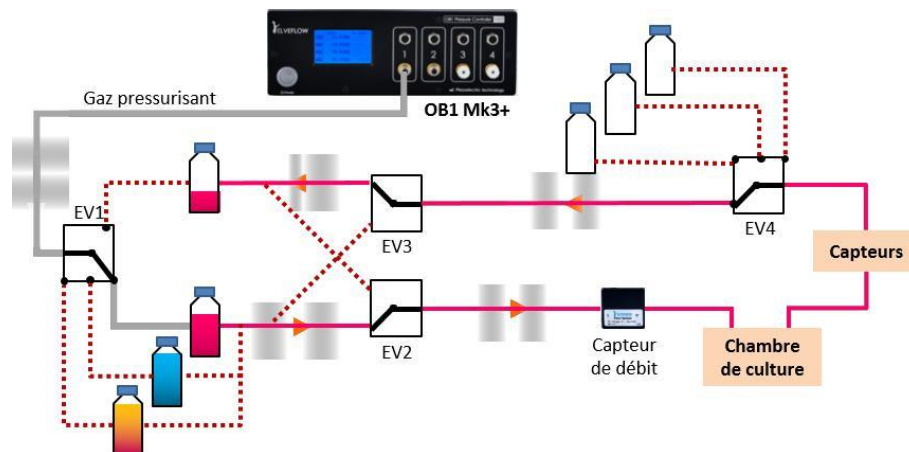


Figure 35 | Intégration d'électrovalves 5:4.

Système permettant l'automatisation complète des procédés de prélèvement d'échantillons et de changements de milieu de culture jusqu'à 3 itérations consécutives.

II.5 Prototype et perspectives d'évolution

Les caractéristiques techniques décrites dans les Chapitres II.2 à II.4 résument les fonctions clés du système de perfusion. Néanmoins, ce dispositif a également été conçu de sorte à faciliter l'implémentation d'améliorations et de fonctions supplémentaires. Le prototype de la chambre de culture ainsi que certaines perspectives d'évolution du système dans sa globalité sont présentés ci-dessous.

II.5.1 Chambre de culture

Le design de l'itération la plus récente du prototype est présentée **Figure 36**. Ce design répond aux contraintes fonctionnelles de distribution des contraintes de cisaillement (*cf.* Chapitre II.3), de distance entre l'objectif du microscope et la face inférieure du support (1,5 mm), de compacité (38x42x25 mm), et d'ergonomie (deux pièces vissées à la main). Les manipulations préliminaires confirment l'étanchéité du dispositif, la facilité de manipulation de la chambre de culture, et la fonctionnalité de la séquence de recirculation. Ce design permet également différents types d'assemblage des chambres de culture entre elles, comme mentionné Chapitre II.2 et illustré Figure 37.

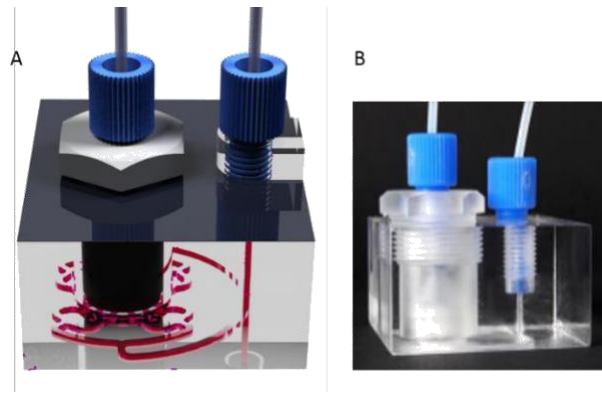


Figure 36 | Prototype de la chambre de culture.

(A) Image numérique du prototype de la chambre de culture (CATIA V5.1, Dassault Systems, FRANCE) (B) Premier prototype concret réalisé au laboratoire.



Figure 37 | Assemblage de chambres en unité.

Image numérique représentant 24 chambres de culture avec 4 groupes de 6 chambres placées en série, réalisé avec le logiciel CATIA V5.1 (Dassault systems, France).

La prochaine révision de la chambre concerne l'optimisation de la distance entre l'entrée des canaux du support de culture et la face inférieure de la chambre (Figure 38). Plus particulièrement, la réduction de l'épaisseur de la couche de milieu de culture entre la plaque et le support permet de limiter les risques d'effets parasites pour une observation en microscopie de fluorescence (e.g., autofluorescence, absorption du signal lumineux). L'intégration d'une encoche au design du support de culture (cf. Chapitre II.5.2), permettrait notamment au support d'affleurer le motif d'alimentation indépendamment de l'épaisseur de la butée. Cette dernière pourra également être augmentée pour prévenir la déformation potentielle de la paroi lors du serrage. La profondeur d'usinage du motif d'alimentation peut, quant à elle, vraisemblablement être sensiblement diminuée (e.g., de 0.50 mm à 0.25 mm). Cette diminution devra néanmoins faire l'objet d'une revalidation numérique de la distribution des contraintes de cisaillement et d'un réajustement des paramètres géométriques du collecteur. Enfin, les plaques de PMMA utilisées pour la face inférieure étant disponibles sur une gamme d'épaisseur de 0,25 à 1 mm, la réduction des dimensions de cette plaque pourra également être explorée.

Les contraintes de design du dispositif sont également liées aux matériaux et techniques de fabrication disponibles dans l'environnement direct du laboratoire. Dans le cadre d'un développement commercial, d'autres modes de fabrication pourraient être mis en œuvre, menant potentiellement à des améliorations en termes de compacité des chambres de cultures et des coûts de production.

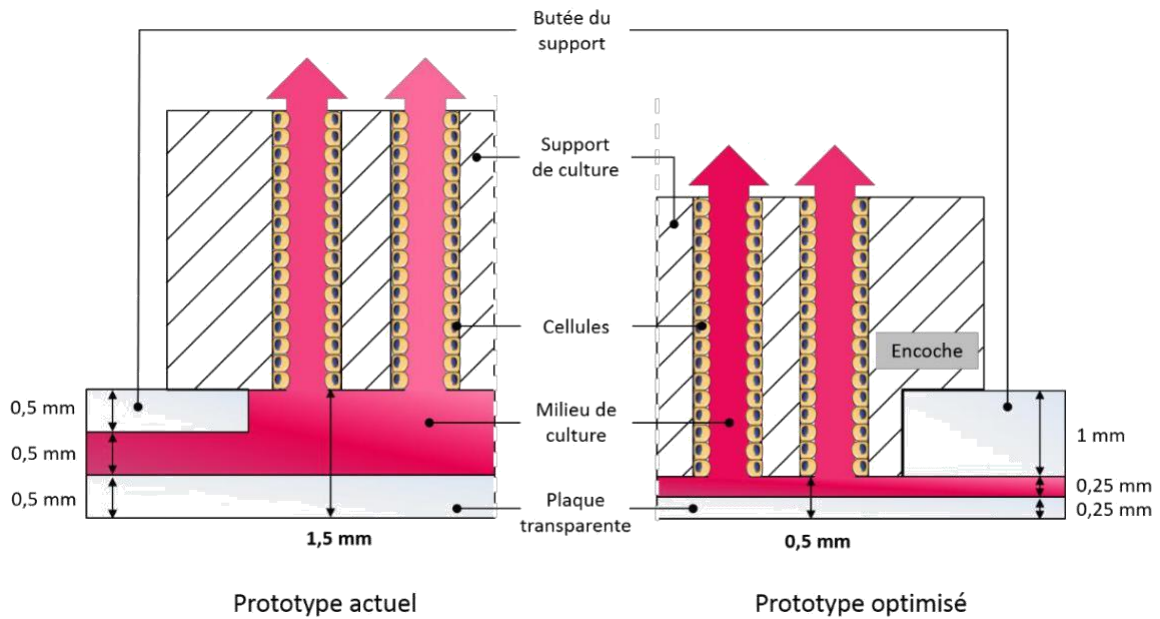


Figure 38 | Optimisation du design de la chambre de culture.
 Une réduction de la distance entre l'entrée des canaux du support de culture et la face inférieure de la chambre (i.e., fond de la plaque transparente) peut être envisagée pour augmenter la profondeur d'analyse au sein du support de culture par microscopie.

II.5.2 Architecture du support de culture

Comme décrit précédemment (Chapitre II.3.1), les supports de culture ont été conçus en première approche sur la base de canaux cylindriques traversants de section constante (**Figure 39**), afin de générer des contraintes de cisaillement uniformes sur l'ensemble de la surface de culture et ainsi permettre une évaluation plus simple des différentes gammes d'influence des paramètres « cisaillement » et « vitesse » sur le comportement d'un type cellulaire (Chapitre III.1).

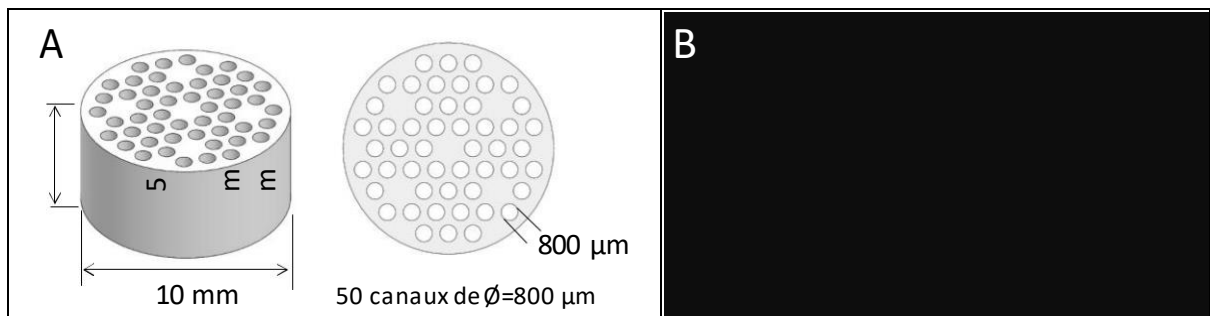


Figure 39 | Support de culture pour l'étude des différentes gammes d'influence des paramètres « cisaillement » et « vitesse » sur le comportement d'un type cellulaire.

(A) Image numérique (logiciel ScanIP, Simpleware, Royaume-Unis) et (B) photos des supports de culture réalisés en hydroxyapatite, traversés de canaux cylindriques uniformes (50 canaux cylindriques de 800 μm de diamètre).

Certaines macroarchitectures disposent néanmoins de qualités pertinentes. Notamment, les macroarchitectures basées sur les surfaces triplement périodiques (TPMS), qui incluent les gyroïdes et les structures diamant (Kapfer et al. 2011; Montazerian et al. 2017), ont été identifiées comme particulièrement intéressantes pour la régénération osseuse. En effet, les réseaux de macropores ouverts, réguliers et interconnectés qui les constituent permettent de moduler les propriétés mécaniques du support (Kapfer et al. 2011; Melchels et al. 2010b) et de faciliter le transport de

masse et l'invasion des cellules et des tissus. Des études *in vitro* en statique ont confirmé une meilleure perméabilité des supports de culture et une meilleure pénétration de cellules mésenchymateuses stromales pour un support gyroïde que dans un support d'architecture semi-aléatoire de porosité et de taille de pores comparables (Melchels et al. 2010a). Ces structures ont également été qualifiées de « biomorphiques » de par leur courbure moyenne qui les rapprochent des caractéristiques géométriques de l'os trabéculaire (Jinnai et al. 2002).

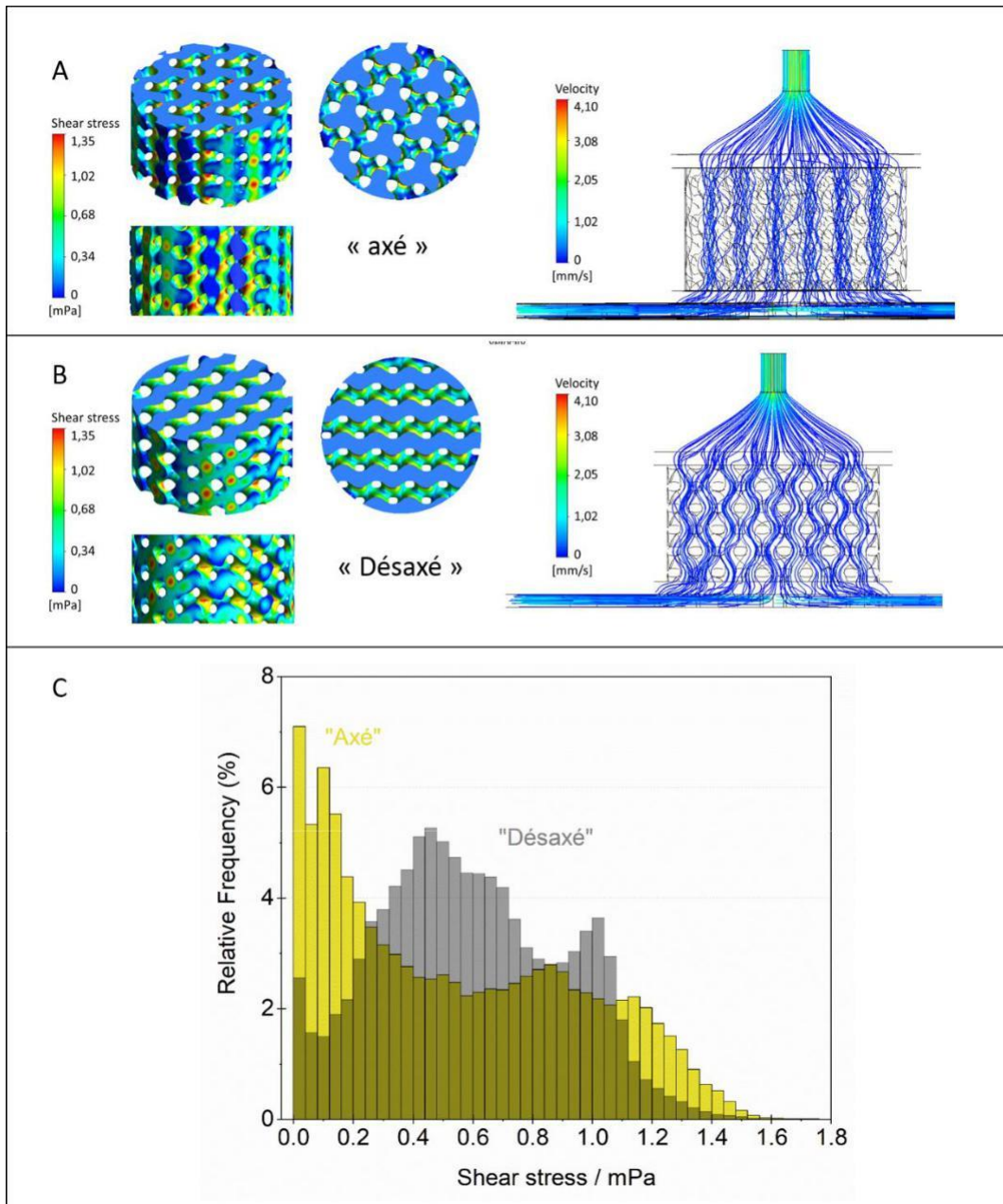


Figure 40 | Comportement de l'écoulement dans des supports de culture basés sur des géométries triplement périodiques de surface minimale (TPMS).

Distribution des contraintes de cisaillement et configuration des lignes de courant dans une gyroïde dont la « grande porosité » est (A) axé et (B) désaxée dans la direction de la vue isométrique. (C) Histogrammes représentant la fréquence relative de différents niveaux de contraintes de cisaillement dans la porosité des supports de culture d'architecture gyroïde « axé » et « désaxé ». Ces valeurs ont été déterminées à l'aide de l'outil d'analyse statistique du logiciel OriginPro 2018b (Northampton, États-Unis) sur la base des données extraites des valeurs de cisaillement aux nœuds du maillage de la surface de la gyroïde des Figure 40A et B.

Outre ce paramètre macroscopique de l'architecture des supports de culture, le procédé de fabrication développé et mis en place au laboratoire pour fabriquer ces céramiques (**Figure 41A**, thèse B. Charbonnier ([Charbonnier 2016](#))) permet de contrôler d'autres niveaux architecturaux tout aussi importants tels que la microtopographie (**Figure 41B**, ([Marchat and Champion 2017](#))). Cette microtopographie peut notamment être optimisée pour améliorer l'ensemencement cellulaire des canaux. Par exemple la disposition de microsillons, de 20 μm de profondeur et 20 μm d'espacement, transversalement par rapport au flux (**Figure 42A**) améliore la distribution des cellules sur toute la profondeur des canaux (**Figure 42B**). Toutefois ces tests préliminaires réalisés manuellement avec un procédé combinant l'agitation (20 rpm, 5 h, 37 °C) du support de culture dans une suspension cellulaire (Lignée C3H10T1/2, passage P11 à P15, $3 \cdot 10^6$ cellules dans 10 mL, milieu DMEM complet : 10% SVF, 1% pénicilline-streptomycine, 1% glutamax®) puis l'application d'un vide primaire (100 mmHg, 3x1 min, 37 °C), n'ont permis d'obtenir que des densités relativement faibles de cellules attachées dans les supports de culture à canaux cylindriques (**Figure 39**), soit 58.400 cellules par support de culture (médiane; max= 66.547; min=40.273 ; N=5 ; dosage de l'ADN avec la technique fluorométrique Picogreen) représentant 9.300 cellules/cm² ([Juignet 2016](#)).

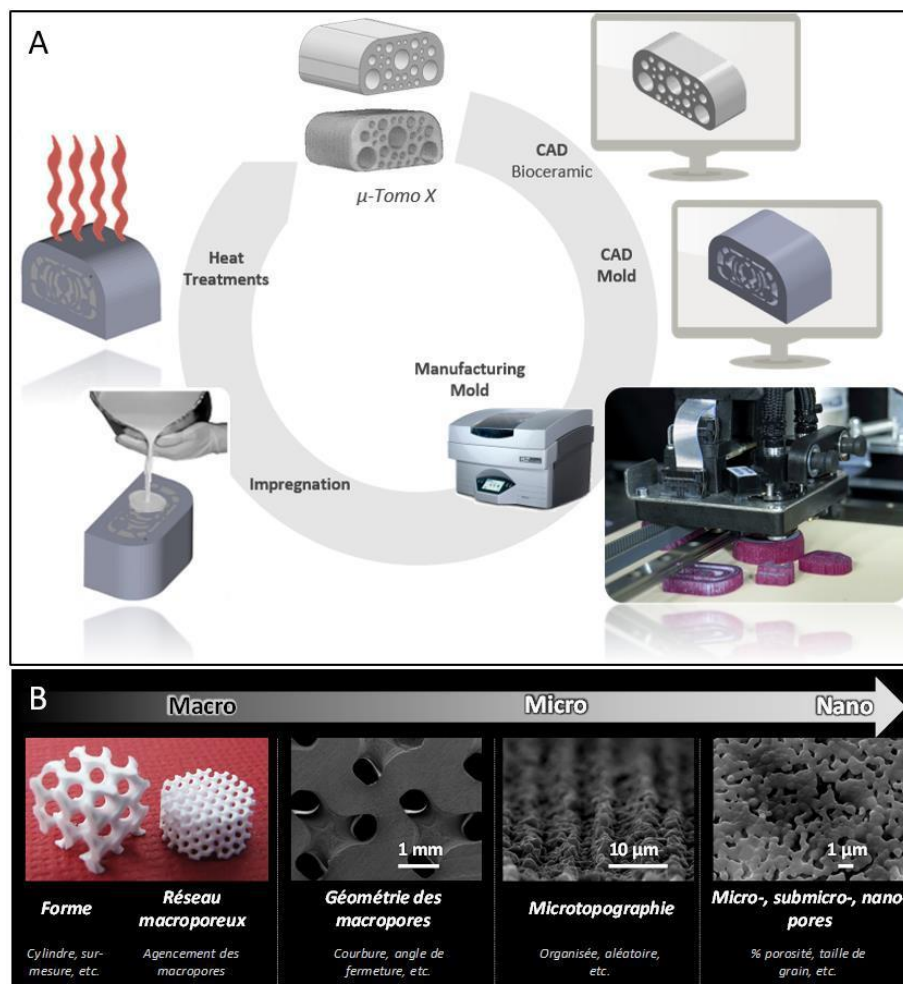


Figure 41 | Contrôle des différents niveaux architecturaux des supports de culture céramique.

(A) Procédé de fabrication des supports de culture à base de phosphates de calcium par imprégnation d'un moule en cire fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D du type Drop on Demand (DoD, Solidscape, 3ZStudio, Etats-Unis) ([Charbonnier et al. 2016](#)). (B) 5 niveaux architecturaux, pouvant influencer le comportement cellulaire ([Marchat and Champion 2017](#)), contrôlables par le biais de ce procédé de fabrication.

Cette étape d'ensemencement reste donc très largement perfectible, notamment grâce à l'automatisation (cf. Chapitre II.4), et fera l'objet d'une phase d'optimisation incluse dans le projet ESA BONUS (cf. Chapitre III.1)

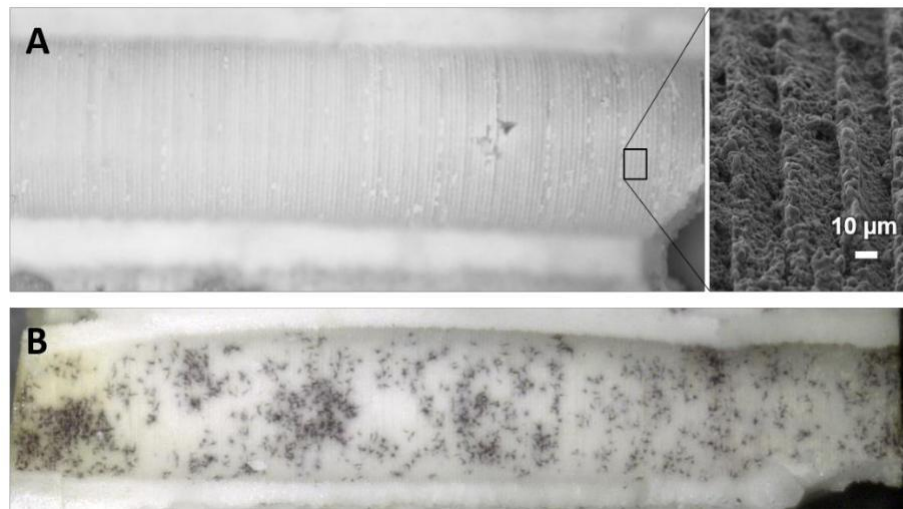


Figure 42 | Microtopographie et ensemencement.

Photo d'une section longitudinale d'un canal de 800 µm de diamètre (support de culture représenté Figure 39) avant ensemencement avec un agrandissement des microsillons transversaux au flux de 20 µm de profondeur et espacés de

20 µm, et (B) après ensemencement manuel avec des cellules de la lignée C3H10T1/2(clone 8) mises en évidence par coloration au sel de tétrazolium (MTT). Une répartition relativement homogène, mais toutefois peu dense, de cellules vivantes est observée sur la totalité du canal.

II.5.3 Évolutions du système

La vision à long terme d'un tel dispositif de culture serait un système capable d'adapter de façon entièrement autonome l'ensemble des paramètres de culture, de l'environnement mécanique à la composition chimique du milieu, en fonction de l'évolution des activités cellulaires mesurées et de la question scientifique poursuivie. Au-delà d'un criblage pharmaceutique, un tel système pourrait par exemple être paramétré pour maximiser la vitesse de formation de tissu néoformé et utilisé à terme pour la culture de greffons osseux. Si de telles perspectives restent distantes, la structure du montage associée à l'interface programmable des composants Elveflow® permettent néanmoins d'envisager l'implémentation rapide de certaines itérations dans cette direction.

Dans le Chapitre I, section 5.2.4 de la revue, nous évoquons les limites d'un protocole de perfusion des cultures 3D par un débit constant. Le dépôt de matrice extra-cellulaire modifiant les caractéristiques des chemins d'écoulements disponibles (*e.g.*, réduction ou obstruction progressive des pores et canaux), une valeur fixe de débit pourrait avoir des effets antagonistes au cours de la culture (*cf.* Equation 10). Nous avançons qu'un contrôle de l'écoulement par un paramétrage du delta de pression permettrait d'adapter le débit entrant au cours de la culture de manière autorégulée (*cf.* Equation 11) et physiologiquement pertinente. À cet égard, le couplage entre l'unité de pressurisation et le capteur de débit utilisés dans le système permet de mesurer simultanément le delta de pression imposé et le débit correspondant, et de choisir le paramètre le plus pertinent à utiliser pour piloter l'écoulement. Le dispositif pourra donc non seulement être utilisé en pilotage par pression, mais permettra également de comparer directement les deux modes de culture. Une culture perfusée par un débit constant de 1 mL/min pourra par exemple être comparée à une culture soumise à un delta de pression

constant correspondant initialement (*i.e.*, avant l'apparition de matrice extracellulaire) à un débit de 1 mL/min.

Le système pourra également être programmé pour réagir aux informations relevées par les capteurs. Dans un montage en recirculation, les capteurs d'O₂, de glucose, et de pH, utilisés pour évaluer l'activité cellulaire pourront par exemple déclencher automatiquement le renouvellement du milieu de culture au franchissement de seuils prédéfinis.

Chapitre III – Validation et valorisation

III. Validation et valorisation scientifique et industrielle

Le contrôle rigoureux de l'environnement mécanique et la possibilité de suivre en direct l'évolution des fonctions biologiques par microscopie à fluorescence, auparavant réservés aux modèles bidimensionnels, font de ce système de culture un candidat prometteur pour répondre au besoin de modèles de tissus osseux standardisés.

Les retombées attendues de tels modèles sont une réduction drastique du coût, du temps et du poids éthique de la recherche, notamment dans les applications suivantes :

1. le développement de thérapies avancées, préventives ou curatives, via la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la physiologie et physiopathologie de l'os ;
2. l'aide au développement de stratégies de culture pour la fabrication de greffons osseux vivants pour des applications en médecine régénératrice (ingénierie tissulaire osseuse), en aidant par exemple à mieux comprendre l'impact des facteurs mécaniques et biochimiques sur les cellules osseuses ;
3. le criblage de molécules ostéo-actives ou anti-cancéreuses en remplacement des modèles animaux (industries pharmaceutiques et biomédicales). Cette stratégie « Organ-on-chip » n'existe pas pour l'os ;
4. l'intégration d'un modèle de tissu osseux aux systèmes « **body-on-chip** » en cours de développement. Ces systèmes connectent entre eux des modèles de différents tissus et organes (Skardal et al. 2017) dans l'objectif de récapituler de façon exhaustive la physiologie humaine, et représentent aujourd'hui un objectif stratégique majeur en biologie exploratoire.

Les phases de développement nécessaires pour atteindre la mise à disposition d'un tel outil aux acteurs industriels et académiques dépassent le cadre de cette thèse. Plusieurs stratégies ont donc été mises en place pour assurer la continuité technique, scientifique et commerciale du projet au-delà de cette thèse. Ce chapitre souhaite présenter ces stratégies et leurs rôles dans la transition de notre invention en innovation.

La vocation du système développé étant de simplifier et fiabiliser la mise en œuvre de tels systèmes de culture en 3D, de contrôler rigoureusement l'environnement mécanique et chimique des cellules au sein du support de culture ainsi que de suivre en direct l'évolution de leurs fonctions biologiques, il est primordial de valider techniquement, mécaniquement et biologiquement les fonctions de bases du système (e.g., ensemencement et culture automatique). Ces validations, coûteuses, ont été intégrées dans un projet de recherche appliquée, impliquant différents acteurs industriels et académiques, et déposé au programme SciSpaCE Microgravity Application de l'Agence Spatiale Européenne (ESA).

Ce système et les modèles de tissus osseux qui en résulteront ouvrent de nouveaux paradigmes scientifiques et thérapeutiques. Néanmoins, une tâche essentielle pour que ce prototype devienne un outil accessible et utilisé est la transformation de notre invention en une innovation par le biais notamment de sa commercialisation. Cette transition est accompagnée par la Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT) PULSALYS, et s'inscrit dans la dynamique de transfert des technologies spatiales vers leurs potentielles applications « grand public » soutenue par l'ESA.

III.1 Projet ESA-BONUS

Le SciSpace Microgravity Application est un programme de l'ESA basé sur un appel à projets continu visant à mettre à profit les compétences spécifiques des entreprises et laboratoires Européens pour répondre à des problématiques scientifiques liées à la microgravité. Les projets soumis lors de cet appel sont évalués non seulement sur leur pertinence scientifique, mais également sur leurs potentielles retombées industrielles et sociétales. Ainsi, il implique obligatoirement des partenaires industriels et académiques. Le développement du système de culture est intégré au projet « *In vitro and in vivo pre-screening models and services for space and terrestrial interventions against BONE and muscle fragility* », ou BONUS, porté par un consortium académique coordonné par le MEDES, et composé du laboratoire Sainbiose UMR1059 (Fr), et des Universités de Bari (It), Gênes (It), et Cambridge (UK). Les partenaires industriels sont Elvysys (Fr), Atlantic Bone Screen (Fr), Stemnovate (UK), Greenbone (It) et Kayser Italia (It). Le rapport d'évaluation est présenté en **Annexe 1**.

III.1.1 Contexte scientifique

Malgré un conditionnement physique rigoureux, le squelette des astronautes de retour d'une mission sur la station spatiale internationale (ISS) présente des altérations microstructurelles partiellement irréversibles (Vico and Hargens 2018; Vico et al. 2017). Après la mission spatiale de 30 jours Bion M1 (Gerbaix et al. 2017), le squelette des souris étudiées présentait une infiltration de tissus adipeux dans la moelle osseuse et une chute de la population ostéocytaire. Ces symptômes, qui sont également ceux du vieillissement, relèvent de processus irréversibles. La sarcopénie, l'ostéoporose, et l'infiltration de tissus adipeux accompagnent également les symptômes de pathologies de plus en plus prévalentes telles que le cancer ou l'obésité, détériorant l'état clinique, le pronostic et la qualité de vie des patients atteints. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace contre ces symptômes.

Le projet BONUS répond au besoin urgent de développement de stratégies thérapeutiques permettant de préserver l'intégrité du système musculo-squelettique, notamment via la régulation du dialogue biologique entre les tissus musculaires et osseux, dont le développement et l'homéostasie sont étroitement corrélés.

En 2017, une équipe de l'Université de Bari, rattachée au consortium, a mis en évidence les effets de l'irisine recombinante sur la prévention de la perte osseuse et musculaire chez des souris dont les membres inférieurs ont été déchargés par suspension caudale (Hind-Limb Unloading, ou HLU) (Colaïanni et al. 2017b). Le projet BONUS vise à évaluer le potentiel de l'irisine au moyen de modèles existants de microgravité *in vivo* (HLU) et *in vitro* (Random Positioning Machine, ou RPM) (Wuest et al. 2015), ainsi que de modèles *in vitro* élaborés à l'aide du système développé dans le cadre de cette thèse. Le contrôle de l'environnement fluide et l'évaluation de l'activité cellulaire rendues possibles par le dispositif permettront de comparer les effets de l'irisine et de différents niveaux de stimulation mécanique sur l'ostéoblastogénèse et l'ostéocytogénèse, et d'évaluer la capacité de l'irisine à se substituer à la stimulation mécanique dans les voies de signalisation de la mécanotransduction.

La structure du WP1200 « In vitro 3D perfusion culture and monitoring system », centré sur notre dispositif, est présenté **Figure 43**. Ce workpackage est structuré sur les trois volets « développement du dispositif » dont les sous parties WP1211 et WP1212 ont été exposées au chapitre II, « validation biologique », et « évaluation biologique de l'irisine ».

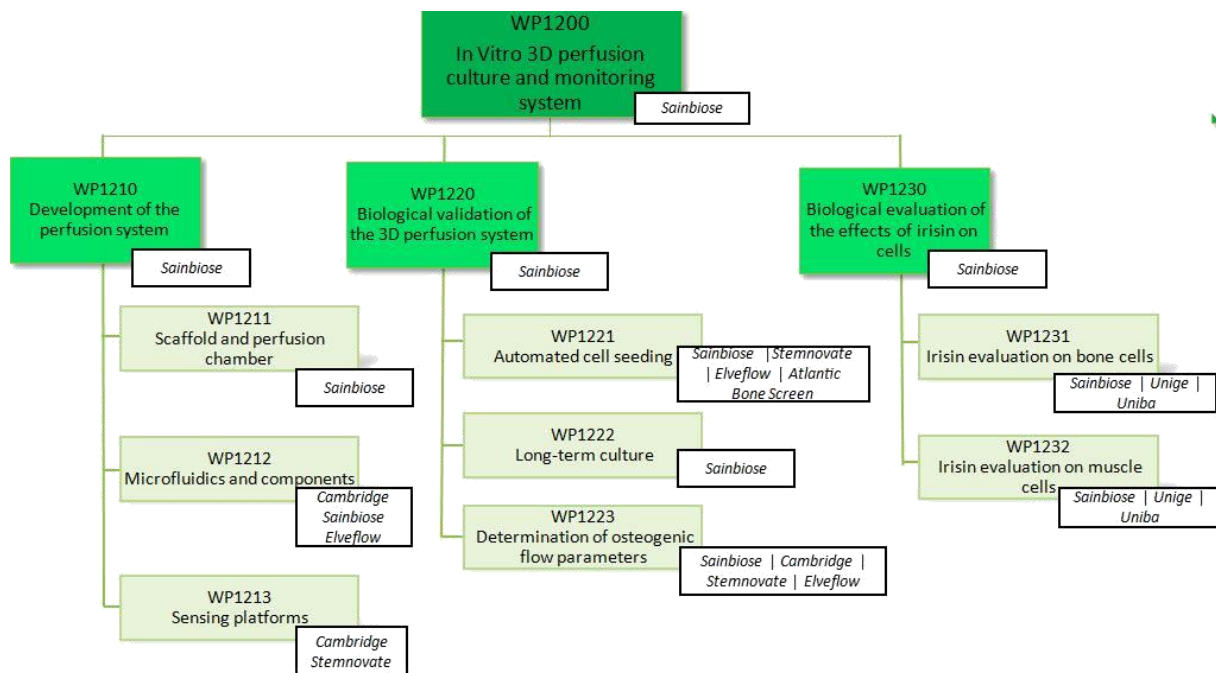


Figure 43 | Structure du WP1200 du projet BONUS.

Le WP est séparé en trois volets, à savoir le développement du dispositif (WP1210), sa validation biologique (WP1220), et l'évaluation biologique des effets de l'irisine (WP1230).

III.1.2 Validation biologique du système

Les phases de validations biologiques seront réalisées en priorité avec deux types cellulaires. Dans un premier temps, nous favoriserons l'emploi d'une lignée cellulaire non cancéreuse de type pré-ostéoblastique issue de calvaria de souris MC3T3-E1 (Kodama H. A. 1981). Cette lignée est très utilisée en ingénierie tissulaire osseuse en raison de sa facilité de culture, d'une prolifération active et de sa grande capacité de différenciation en réponse à certains matériaux, notamment les biomatériaux à base de phosphates de calcium, avec ou sans milieu de différenciation (Chou et al. 2005; Sudo et al. 1983). Toutefois, même si cette lignée semble être appréciée pour l'étude de la différenciation ostéoblastique, les résultats montrent qu'elle doit être utilisée avec précaution pour ce type d'étude puisque sa capacité de différenciation mais également de minéralisation de la matrice extracellulaire changent en fonction des sous-clones et des variantes utilisés (Bonewald et al. 2003; Wang et al. 1999). Ainsi pour les évaluations biologiques nécessitant un tissu ostéoïde (e.g., tissu osseux non encore minéralisé) ou minéralisé intégrant des ostéocytes, nous privilégierons l'emploi de cellules primaires de calvaria de souris (Bouet et al. 2015a; Bouet et al. 2015b), ou de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) (Bouet et al. 2019). Une étude comparative des différences de comportements des cellules MC3T3-E1 et primaires en fonction de l'environnement fluide pourrait être d'un grand intérêt (Arriero et al. 2012).

III.1.2.1 Validation de l'ensemencement

L'ensemencement est une étape critique de la culture cellulaire. Un ensemencement hétérogène entre les supports de culture d'une même expérience, pouvant par exemple résulter d'un protocole inefficace, d'une variabilité inter-supports ou inter-opérateurs, compromet la significativité de l'ensemble des résultats obtenus.

L'activité et le devenir cellulaire sont significativement impactés par le protocole (Reynolds et al. 2018; van den Dolder et al. 2003) et les paramètres d'ensemencement tels que la densité cellulaire (Yassin et al. 2015; Zhou et al. 2011). Il est également raisonnable de supposer que la variété des protocoles d'ensemencement présents dans la littérature aggrave la problématique de transférabilité des résultats en ingénierie tissulaire osseuse (cf. Chapitre I section 5.2.2 de la revue). De plus, beaucoup de ces protocoles requièrent de retirer manuellement le support de culture du milieu ou de la solution cellulaire utilisée, générant un stress biologique supplémentaire et augmentant à la fois les risques de contamination et la charge de travail de l'opérateur. Ainsi, la mise en place de protocoles d'ensemencement entièrement automatisés dans un environnement mécanique contrôlé permettrait de résoudre ces problématiques et de disposer d'un outil performant pour la génération de modèle osseux standardisés.

Une étude paramétrique menée à partir des données de la littérature disponibles, notamment sur le dispositif U-tube de CELLEC Biotek AG (Amadeo et al. 2018; Papadimitropoulos et al. 2014; Papadimitropoulos et al. 2013; Wendt et al. 2006a), permettra d'identifier la combinaison optimale des paramètres d'ensemencement suivants :

- Le type de perfusion (unidirectionnelle ou oscillante, et les paramètres du profil de perfusion en cas de perfusion dynamique),
- La vitesse du milieu de culture à l'intérieur du support de culture,
- Le cisaillement fluide appliqué aux parois du support,
- La concentration cellulaire et le volume de solution,
- La présence d'une phase de pré-incubation acellulaire,
- La durée de la phase d'ensemencement.

Les protocoles testés seront évalués sur le nombre de cellules attachées à la surface du support, l'homogénéité de leur répartition, leur fonctionnalité, et la reproductibilité des résultats entre chaque échantillon. L'utilisation de supports de culture composés de trois éléments imbriqués, illustrés **Figure 44**, permettra de faciliter l'observation de la répartition des cellules à l'intérieur des canaux tout en maintenant un contrôle rigoureux de l'environnement mécanique pendant la phase d'ensemencement.

Cette phase du projet a également pour ambition de générer des publications qui pourront servir de référence en ingénierie tissulaire osseuse quant aux valeurs des paramètres à favoriser pour maximiser la qualité de l'ensemencement en fonction du type cellulaire utilisé.

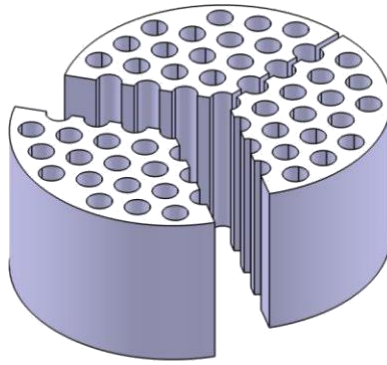


Figure 44 | Modèle de support de culture avec éléments dissociables. Image numérique d'un support de culture composé de trois éléments imbriqués destiné à l'observation de la qualité de l'ensemencement et du tissu formé au sein des canaux (CATIA V5.1, Dassault Systems, France)

III.1.2.2 Validation du protocole de culture

La validation d'un protocole d'ensemencement standardisé permet d'établir une base stable pour le développement des protocoles de culture, l'objectif étant le maintien d'une population cellulaire active sur une durée de 8 semaines, soit significativement plus longtemps que la durée « standard » de 2 à 3 semaines communément rencontrée dans la littérature (Bouet et al. 2015b; Papadimitropoulos et al. 2011). Lors de travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire (Juignet et al. 2017), des cultures de cellules murines de calvaria cultivées sur des supports en hydroxyapatite texturés de macrosillons ont conduit à un dépôt de matrice minéralisée contenant des cellules exprimant de l'ostéocalcine et de la sclérostine (marqueurs respectifs de la différenciation ostéoblastique et ostéocytaire), après 2 semaines. Plusieurs semaines de culture supplémentaires permettent d'envisager le dépôt d'un tissu ostéoïde fonctionnel incluant des ostéocytes.

Dans un premier temps, les cultures seront perfusées par un débit unidirectionnel constant, permettant le maintien d'un environnement mécanique stable tant que l'épaisseur de la matrice extra-cellulaire reste faible par rapport au diamètre des canaux. Comme développé dans les Chapitres I et II précédents, deux facteurs déterminants de l'environnement cellulaire en culture perfusée sont (1) le transport de masse, dont le terme convectif est défini par la vitesse de circulation du milieu, et (2) les contraintes mécaniques appliquées aux cellules, principalement sous forme de cisaillement fluide. Ces paramètres impactent le comportement cellulaire de façon indépendante, mais sont liés physiquement par une relation de proportionnalité dont la constante dépend de la viscosité du milieu et des caractéristiques géométriques du système (cf. Chapitre I, section I.1 de la revue). La méthode

« traditionnelle » de calibrage d'un système de culture perfusé consiste à faire varier le débit sur une plage de valeur fixée arbitrairement ou à partir d'une plage cible de valeurs de cisaillement (Cartmell et al. 2003; Grayson et al. 2008; McCoy et al. 2012; McCoy and O'Brien 2010). Cependant, une variation du débit entraînant la variation simultanée de la vitesse de circulation et des contraintes de cisaillement, cette méthode ne permet d'explorer qu'une portion restreinte du champ paramétrique disponible. La Figure 45 illustre l'utilisation de cette stratégie dans notre dispositif.

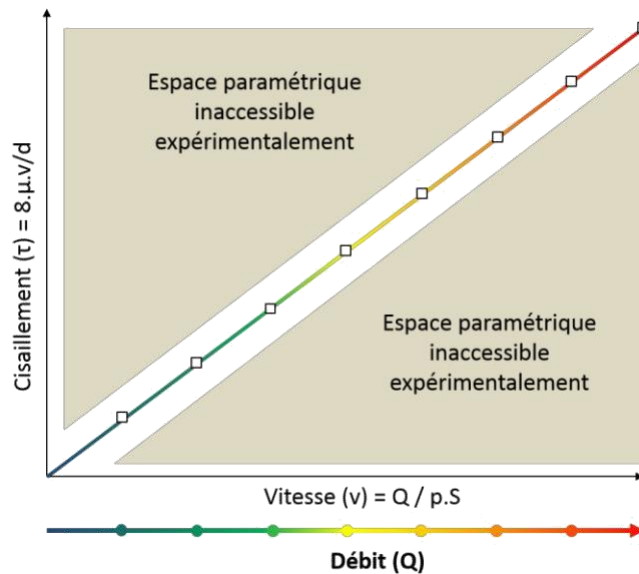


Figure 45] Stratégie de criblage « traditionnelle » de l'environnement fluide par modulation du débit.

Position dans le champ paramétrique [Cisaillement-Vitesse] des points de données accessibles par le biais d'une variation du débit dans notre dispositif permettant d'obtenir une distribution des contraintes de cisaillement relativement resserrée au sein du support de culture à canaux cylindriques (cf. Figure 39).

Le design du support de culture sélectionné (canaux cylindriques de section constante, **Figure 39**) présente l'avantage de permettre une application directe de la loi de Poiseuille-Hagen $\tau = 8.\mu.v/d$ (cf. Chapitre I Équation 4 de la revue), qui permet le contrôle simple et précis de la constante $C = 8.\mu/d$ reliant le cisaillement et la vitesse. Une augmentation de la viscosité du fluide entraînant les mêmes conséquences que la réduction du diamètre des canaux sur nos paramètres d'intérêt, une étude préliminaire permettra d'identifier l'approche la plus adaptée à notre application. À notre connaissance ce type de résultat, qui permettrait d'identifier et de caractériser l'influence de la viscosité et/ou du diamètre des canaux sur le comportement cellulaire, n'a jamais été publié et permettrait de valoriser scientifiquement notre approche.

Comme présenté **Figure 46**, faire varier le débit pour différentes valeurs de la constante C nous permettra d'établir une cartographie du champ paramétrique vitesse-cisaillement. Ce type de criblage n'a été approché qu'une fois (Li et al. 2009) par variation de la viscosité, avec des supports de culture d'architecture hétérogène fabriqués par « particle-leaching » (exemple Chapitre I Figure 12 de la revue) et sans contrôle de l'écoulement, donc sans possibilité d'associer les résultats obtenus avec les valeurs de cisaillement et de vitesse de circulation correspondantes. Ce projet constituerait donc la première étude à examiner directement et séparément les influences des contraintes de cisaillement et des phénomènes de transport de masse dans des supports 3D. Cette méthodologie nous permettra de réaliser un criblage extensif des réponses cellulaires dans différents environnements mécaniques reproductibles, et de proposer une base de données de comportement par type cellulaire en fonction de l'environnement mécanique.

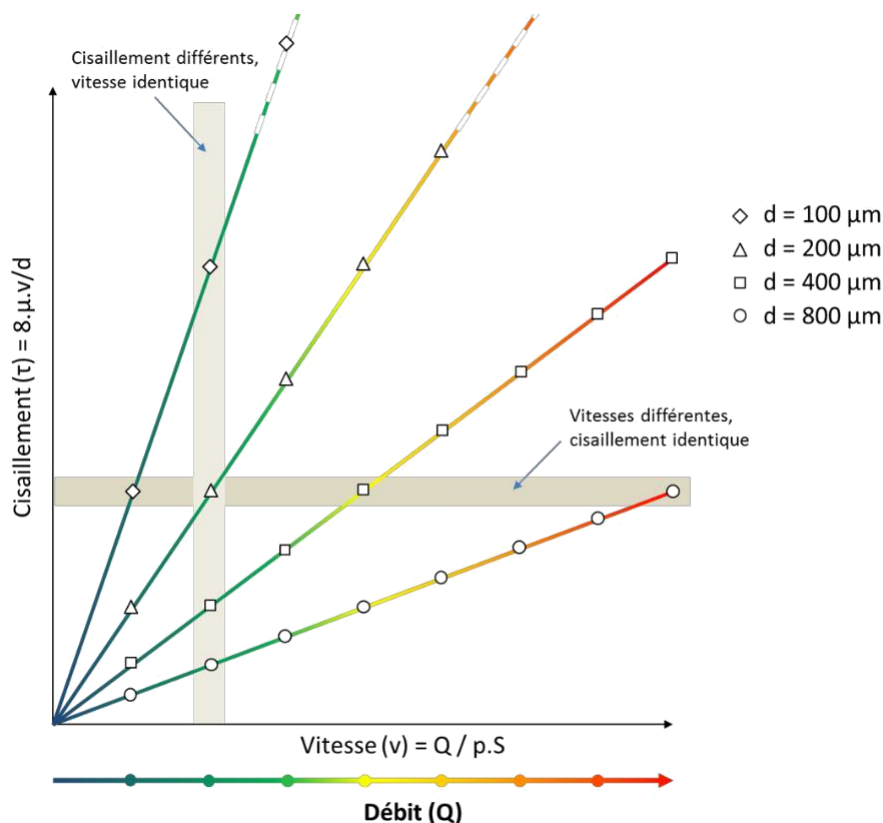


Figure 46 | Stratégie de criblage optimisée de l'environnement fluide.

Représentation des points de données accessibles dans le champ paramétrique [Cisaillement-Vitesse] par variation du débit pour différentes constantes $C = 8\mu/d$, ici obtenues en utilisant des supports de culture traversés de canaux de diamètres différents (cf. Figure 39 pour un support de culture avec des canaux de $d = 800\mu\text{m}$).

Des analyses seront réalisées jusqu'à 8 semaines de culture afin d'évaluer différents paramètres biologiques, tels que la mort (i.e., apoptose et nécrose), la prolifération et la différenciation cellulaire, en fonction des paramètres de culture.

Les capteurs en ligne (en cours de développement) permettront de mesurer les sécrétions de FABP4 (marqueur de différenciation adipocytaire), et de phosphatases alcalines (ALP), DMP1, VEGF et sclérostine (marqueurs de différenciation et d'activité ostéoblastique et ostéocytaire). Ces analyses seront complétées par des analyses de la production de matrice collagène de type I ou encore de la minéralisation à l'intérieur des canaux du support de culture (e.g., marquages Von Kossa et cytochimique de l'ALP).

Bénéficiant d'une méthodologie de criblage des paramètres de culture innovante, notre objectif est ensuite d'identifier les gammes de valeurs de cisaillement et de vitesse de circulation permettant de générer la réponse ostéogénique la plus marquée pour un type cellulaire donnée. Ce régime de culture devra favoriser la voie de différenciation ostéogénique (e.g., Runx2, ALP, osterix, sialoprotéine osseuse) au détriment de la voie adipogénique (e.g., PPAR γ , C/EBP α , FABP4, adiponectine) pour les cellules de calvaria murine et hMSC, contrairement à ce que l'on peut observer en micro-gravité simulée (Louis et al., 2017, Capulli et al., 2009). Cette combinaison devrait donc stimuler la production de facteurs spécifiques de la formation osseuse dont l'ostéocalcine, et la production de matrice osseuse minéralisée. La production de prostaglandine-E2 (PGE2) et de monoxyde d'azote (NO) par les ostéocytes, ainsi qu'une diminution de sclérostine et de RANKL, sont également attendues, au moins pour les cellules murines. L'observation par immunohistochimie des protéines d'intérêt et de la

morphologie cellulaire (notamment de la morphologie étoilée caractéristique des ostéocytes) sera facilitée par l'utilisation de supports de culture sécables (**Figure 44**).

Sur la base de la **Figure 5** Chapitre I section 3 de la revue et de la stratégie de criblage précédemment proposée (**Figure 46**), la **Figure 47** illustre les zones de comportement cellulaire attendues. Le protocole générant la meilleure réponse biologique en termes de prolifération et différenciation ostéoblastique (halo vert **Figure 47**), voire ostéocytaire, servira de modèle de référence pour l'évaluation biologique des effets de l'irisine. De plus, l'identification effective d'une combinaison optimale de cisaillement et de transport de masse sur la réponse ostéogénique pourrait provoquer des répercussions rapides en ingénierie tissulaire osseuse, en permettant aux différentes équipes à travers le monde d'ajuster leur protocole pour améliorer la viabilité de leur culture et la qualité de leur réponse ostéogénique.

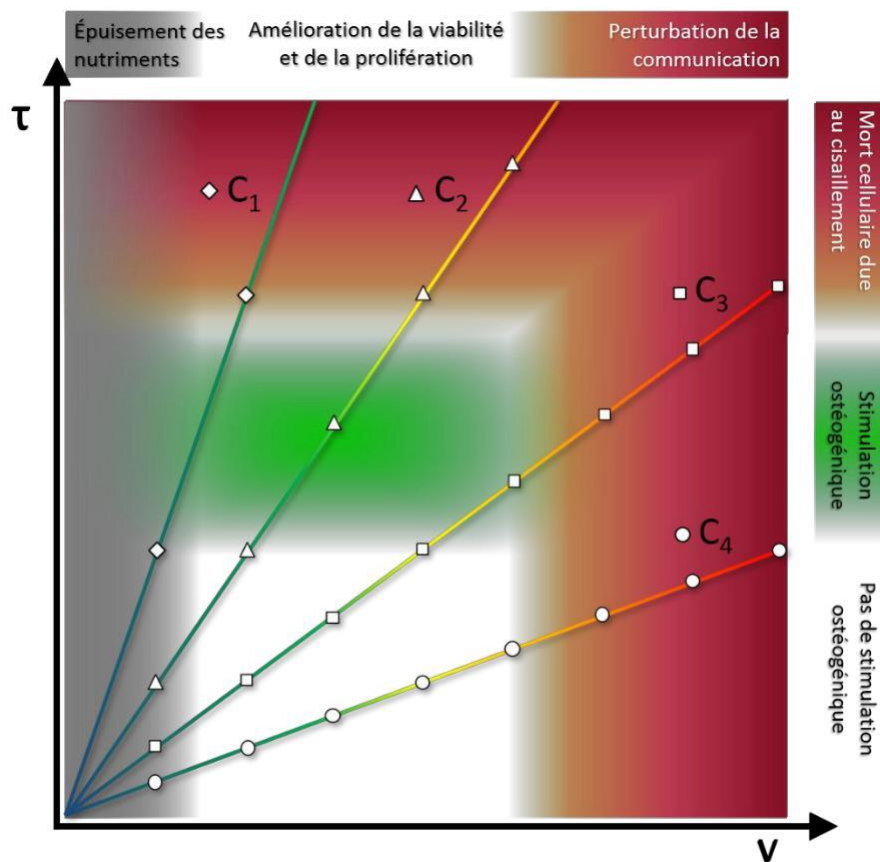


Figure 47 | Cartographie de l'influence des paramètres v et τ sur le comportement de cellules primaires. Graphique combinant la stratégie de criblage optimisée de l'environnement fluide (Figure 46) et les potentielles zones d'influence de cet environnement sur le comportement cellulaire (Figure 5 Chapitre I section 3 de la revue).

III.1.3 Application à l'évaluation biologique des effets de l'irisine

La première étape consistera à reproduire au sein de notre dispositif les résultats obtenus sur des dispositifs 2D, montrant un effet de l'irisine recombinante sur l'expression de l'ALP et du collagène de type I sur des ostéoblastes murins (Colaianni et al. 2017a; Colaianni et al. 2014; Colaianni et al. 2015; Qiao et al. 2016; Zhang et al. 2018). Cette étape a notamment pour objectif d'identifier les ajustements de dosage nécessaires lors du passage du 2D au 3D.

Nous contrôlerons dans des cellules de calvaria murine les marqueurs de protéines associées aux cellules préostéoblastiques (e.g., Runx2, ostéopontine, sialoprotéine osseuse), puis aux ostéoblastes

matures et actifs (e.g., ostéocalcine, RANKL, OPG) et enfin aux ostéocytes (e.g., DMP1, sclérostine, FGF23, RANKL). La lipocaline-2, exprimée par les ostéoblastes et ostéocytes, et dont l'expression a récemment été reliée à la stimulation mécanique, sera également contrôlée (Principi et al. 2019). La minéralisation sera visualisée à l'aide de colorations (e.g., rouge alizarine, Von Kossa, ALP). Ces analyses séquentielles nous permettront d'identifier avec plus de précision à quels stades de la voie de différenciation ostéoblastique et ostéocytaire l'irisine intervient.

La deuxième étape consistera à comparer les effets de l'irisine avec les effets induits par les contraintes de cisaillement. Pour une même vitesse de circulation, des échantillons soumis à des niveaux de cisaillement identifiés comme ostéogéniques (**Figure 47**) seront comparés avec des échantillons soumis à des contraintes mécaniques sub-ostéogéniques supplémentés avec de l'irisine recombinante, afin d'identifier dans quelle mesure l'irisine peut se substituer à la stimulation mécanique des cellules (**Figure 48**). Les effets de la dose et du protocole d'injection (e.g., continu vs alternatif tout au long de la culture) de l'irisine seront étudiés.

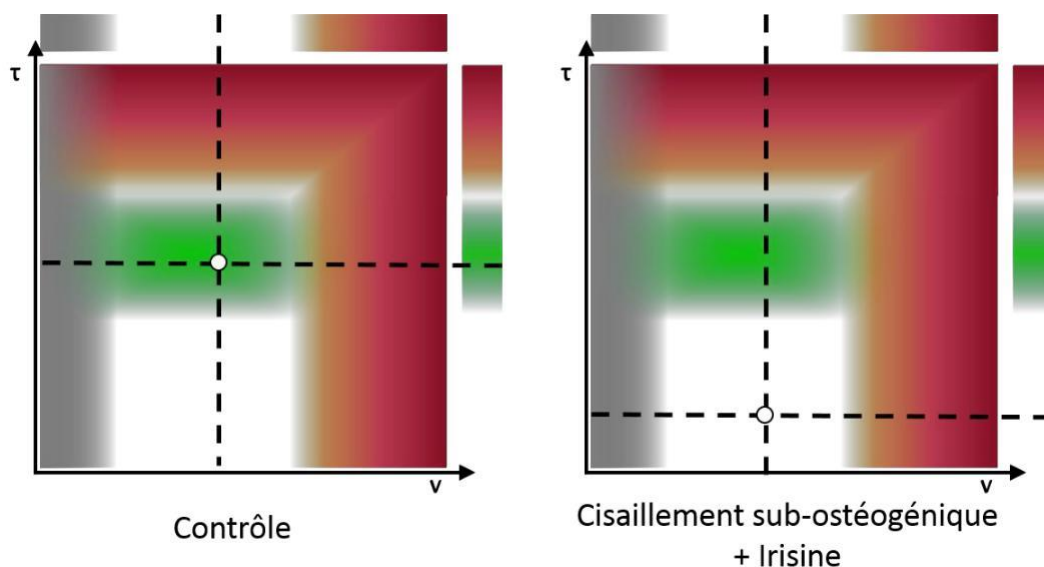


Figure 48 | Evaluation des effets de l'irisine sur la différenciation ostéoblastique et ostéocytaire.
 (A) contrôle positif réalisé en cultivant les cellules dans un environnement fluide (v, τ) ostéogénique, (B) évaluation des effets de l'irisine sur le comportement de cellules primaires cultivées dans des conditions de cisaillement non-ostéogéniques (étude de l'effet de la dose et du protocole d'injection : continu ou alternatif).

Les effets potentiels de protection de l'irisine contre les conséquences de la dégradation de l'environnement fluide (i.e., chimique et mécanique) seront également évalués. Pour cela des cultures de cellules primaires seront réalisées en conditions ostéogéniques jusqu'à l'obtention d'un tissu ostéoïde contenant des ostéoblastes matures voire des ostéocytes (**Figure 49**). Une période de culture de quelques jours permettant d'obtenir des fonctions cellulaires relativement stable devra être déterminée (contrôle positif, **Figure 49A**). Dans cette période « stable », les conditions de cisaillement et de transport de masse seront alors modifiées simulant l'absence de stimulation mécanique du squelette. L'effet de la supplémentation en irisine sur le maintien des fonctions cellulaires sera étudié (mise en évidence notamment des niveaux de production d'ostéocalcine, ALP, BSP). Un des objectifs sera de réaliser ces expériences sur un modèle de tissu ostéocytaire, et de déterminer la capacité de l'irisine à prévenir l'apoptose des ostéocytes (associée à la libération d'ATP et à la production de RANKL), qui est un facteur critique de l'ostéopénie.

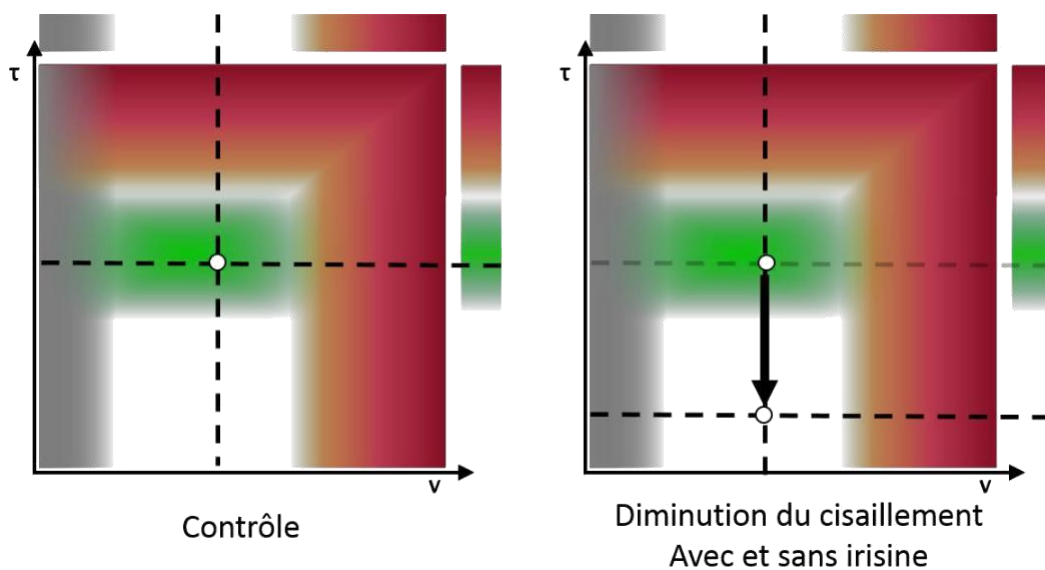


Figure 49 | Evaluation des effets potentiels de protection de l'irisine contre les conséquences de la dégradation de l'environnement fluide.

(A) Contrôle positif réalisé en cultivant les cellules dans un environnement fluide (v ,) ostéogénique permettant d'obtenir un tissu ostéoïde avec des fonctions cellulaires relativement stable, (B) étude de l'effet de la réduction du niveau de contrainte de cisaillement avec ou sans supplémentation en irisine.

III.1.4 Partenariats et perspectives industrielles

L'opportunité de valorisation industrielle constitue un aspect fondamental du projet. Les acteurs privés Atlantic Bone Screen, Stemnovate et Elveflow sont donc pleinement intégrés au consortium, et se positionnent à la fois comme partenaires du développement et de la validation du dispositif, mais également comme parties prenantes des perspectives de valorisation.

Stemnovate est une entreprise de biotechnologie en croissance rapide basée à Cambridge, spécialisée dans le développement de technologies « organ-on-chip » intégrées. Leurs domaines d'expertise incluent les technologies de reprogrammation et de différenciation cellulaires, la microingénierie et les techniques d'analyse biologique adaptées aux systèmes microfluidiques (<https://stemnovate.co.uk/>). Stemnovate développe des plateformes dédiées à l'étude préclinique de molécules pharmaceutiques ciblées, et dispose des licences réglementaires lui permettant d'étudier et d'exploiter des cellules souches humaines à des fins scientifiques et commerciales. Stemnovate se positionne donc comme partenaire précieux pour la caractérisation et la culture des cellules souches utilisées pour les expériences et comme soutien technique dans les différentes phases de développement et d'analyse.

Atlantic Bone Screen est une société de recherche contractuelle (ou « CRO » pour Contract Research Organization) préclinique basée à Nantes, spécialisée dans les pathologies osseuses et articulaires, et dispose d'une plateforme avancée de modèles d'évaluation préclinique incluant de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo*, ainsi que les procédés d'analyses associés. Atlantic Bone Screen contribuera au projet en mettant à profit leur expérience des modèles de tissus osseux pour assister à la validation biologique du système.

Ces deux partenaires, en plus de leur contribution scientifique, se positionnent par leurs spécialités non seulement comme « bêta-testeurs » mais également comme clients prospectifs privilégiés du dispositif.

Elvesys est une entreprise financée sur fonds propres qui développe et fournit des puces microfluidiques et des instruments scientifiques innovants pour la recherche. Leur branche Elveflow (<https://www.elveflow.com/>), centrée sur les équipements dédiés au contrôle d'écoulements microfluidiques, constitue la première marque mondiale de ce secteur. Elvesys dispose également d'une expérience extensive dans le transfert des technologies microfluidiques des laboratoires de recherche vers les marchés de diagnostic médical et de biologie cellulaire. Leur stratégie est notamment basée sur le développement et la commercialisation d'instruments « plug-and-play » facilitant l'utilisation de leurs technologies par des équipes de différentes spécialités scientifiques. L'équipe d'Elveflow apporte une contribution matérielle au projet (i.e., équipements) et nous assiste dans le développement du circuit microfluidique et dans l'évolution potentielle du montage actuel vers une plateforme de culture entièrement intégrée. Au-delà de leur contribution technique, Elveflow se positionne également comme partenaire commercial privilégié pour la distribution de la chambre de culture.

Le transfert des technologies développées pendant ce projet vers ces différents marchés cibles sera accompagné par la SATT Pulsalys (cf. Chapitre suivant III.2).

III.2 Projet Pulsalys STREAM

III.2.1 Présentation du projet

La SATT PULSALYS accompagne la valorisation des travaux de recherche des établissements d'enseignement supérieur de Lyon et Saint-Étienne. À la suite d'un appel à projet lancé à l'attention des doctorants et jeunes docteurs dont les sujets de recherche présentent un potentiel commercial (Programme « Jeunes Chercheurs » de Pulsalys), notre système de culture, baptisé STREAM (System for bone Tissue Relevant Environment And Monitoring), a été retenu par le comité d'investissement de PULSALYS pour faire l'objet d'un accompagnement humain, financier et juridique en vue de son développement commercial.

Comme développé dans les Chapitres précédents, le cahier des charges du système a été défini à partir d'objectifs et de contraintes scientifiques et techniques qui ne suffisent pas à assurer la pertinence commerciale du dispositif. Le rôle principal de l'accompagnement par PULSALYS va être la mise en adéquation de ce cahier des charges avec les exigences propres à une stratégie de valorisation.

III.2.2 Propriété intellectuelle

Cette phase de développement n'étant réalisable qu'au contact des utilisateurs et partenaires industriels prospectifs, la première étape de la démarche de valorisation doit être la gestion de la protection de la propriété intellectuelle liée au projet. Le dépôt d'une demande de brevet concernant la chambre de culture représente un atout considérable pour la valorisation industrielle du projet, et permet également de protéger l'invention à partir de la date du dépôt. Les recherches de l'état de l'art réalisées par l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI) ont révélé des systèmes partageant certaines caractéristiques avec notre dispositif tel que l'agencement spécifique des entrées et sorties fluides pour l'intégration de techniques de microscopie. Ces références regroupent des chambres d'écoulement à plaques parallèles, ou plus généralement 2D ([Akra et al. 2013](#); [Giselbrecht et al.](#)

[2013](#); [McFETRIDGE 2013](#)) et un système de culture en 3D ne permettant pas le contrôle de l'environnement fluide ([Costa 2013](#)) qui ne semblent pas remettre en question le caractère nouveau et inventif de notre dispositif.

Le dépôt du brevet intitulé « Dispositif de culture cellulaire » (Numéro de demande 1860401, cette demande sera rendue publique en Mars 2020) ayant été réalisé par l'Institut Mines Télécom (IMT), la signature d'un accord de licence d'exploitation exclusif entre PULSALYS et l'IMT accorde à PULSALYS la gestion et le développement des actifs intellectuels du projet STREAM.

III.2.3 Les étapes du projet

La phase de structuration du projet (en cours) permet d'établir les premiers contacts avec les partenaires industriels en marge du cadre de la coopération scientifique, d'identifier les axes principaux d'optimisation du dispositif, et la mise au point d'un programme technique détaillé. Ce programme technique servira à préparer les recrutements pour les phases d'optimisation et de validation.

La phase d'optimisation requiert une adaptation du cahier des charges développé dans les parties I et II, portant uniquement sur les spécifications techniques du dispositif, vers un cahier des charges adapté aux contraintes du marché. Cette séquence, qui définira les caractéristiques définitives de la première version du dispositif, devra donc impérativement s'appuyer sur les besoins et habitudes des utilisateurs. Bien que les axes d'optimisation concernés en priorité soient a priori techniques (*e.g.*, développement des capteurs, programmation du système, révision des techniques de fabrication, adaptation du volume de la chambre) la pertinence de cette optimisation reposera avant tout sur l'analyse de l'environnement économique, qui définira également la stratégie de valorisation définitive. Le marché des modèles biologiques *in vitro*, notamment des organes-on-chip, bénéficie de projections de croissance particulièrement fortes. La **Figure 50** présente une étude de marché faite par le groupe Allied Market Research qui prévoit que le marché des organes-on-chip devrait enregistrer un taux de croissance composé (TCAC) de 63,2% de 2017 à 2023 ([Allied Market Research 2017](#)). Une analyse équivalente faite par le Groupe Accuray Research prévoit une croissance annuelle d'environ 69,4%, pour atteindre environ 6,13 milliards de dollars d'ici 2025 ([Accuray Research 2016](#)). Les modèles de tissu osseux, pour l'instant trop rares et/ou rudimentaires, n'apparaissent pas encore dans ces projections malgré les enjeux et dépenses de santé publique majeurs associés aux pathologies de l'appareil squelettique ([Carton et al. 2016](#); [Coxam et al. 2013](#)). Dans ce contexte, le segment de marché dans lequel s'inscrit notre dispositif pourrait donc s'avérer particulièrement stratégique.

Les phases de validation du projet ESA-BONUS, développées au Chapitre III.1, permettront de tester les fonctions du système et d'affiner, si nécessaire, ces dernières du point de vue de l'utilisateur. Ce bêta-test servira ainsi à déterminer la ou les offres les plus pertinentes commercialement (*e.g.*, plateforme intégrée, gamme de chambres et de supports, développement de protocoles). Au-delà de cette preuve de concept, les résultats obtenus serviront à communiquer (*e.g.*, publications dans des journaux à comité de lecture, congrès) sur les aptitudes du système et rencontrer une base d'utilisateurs potentiels.

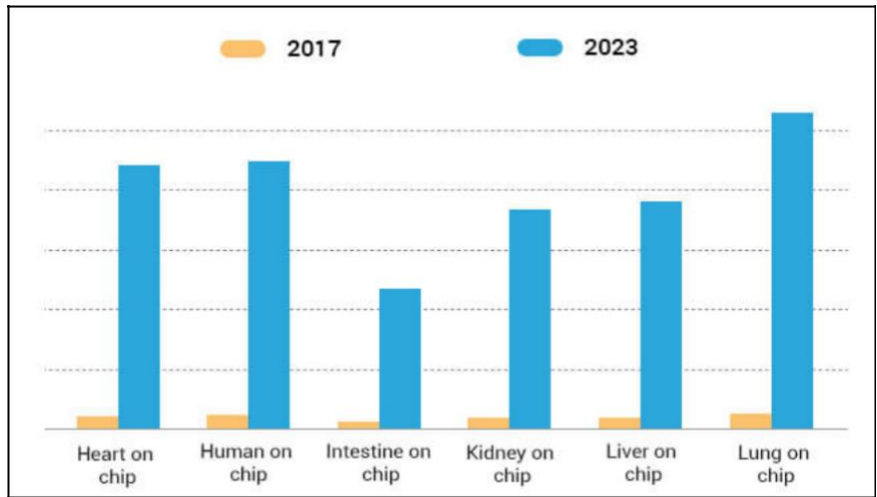


Figure 50 | Taux de croissance composé de l'organ-on-chip entre 2017 et 2023. Analyse et tendance du marché de l'organ-on-chip réalisé par le groupe Allied Market Research (Allied Market Research 2017). Une autre étude du groupe

Conclusion générale

Ces travaux de thèse découlent de l'objectif général du développement d'un système de culture permettant la culture contrôlée, standardisée et simplifiée de cellules osseuses. Dans ce cadre, l'étape nécessaire de recherche bibliographique, à l'origine centrée sur la recherche des paramètres de culture « optimaux » pour le développement de tissu osseux *in vitro*, nous a permis d'identifier des pistes d'amélioration conséquentes des méthodologies associées, notamment en termes de compréhension et de contrôle de l'environnement fluide des supports de culture 3D. Cette méta-analyse de la littérature a fait l'objet d'une publication (« Strategy for standardized bone models ») acceptée dans le journal Biotechnology & Bioengineering.

Ces recherches ont permis de déterminer les spécifications techniques d'un dispositif de culture simple dans sa structure et son utilisation, permettant néanmoins le contrôle précis, validé *in silico*, de la vitesse de circulation du milieu et des contraintes de cisaillement fluides appliquées à la surface du support de culture. Le design de la chambre de culture permet également une compatibilité directe avec les techniques de microscopie de fluorescence confocale et deux photons, inédite dans ce type de dispositif 3D. Une demande de brevet (n° FR1860401) a été déposée et est en cours de traitement par l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI).

Les caractéristiques de ce système ont conduit à son intégration dans un projet européen déposé dans le cadre d'un appel à projet de l'ESA traitant de la prévention de l'ostéoporose chez les astronautes. Ce projet permettra de valider expérimentalement la capacité du système à être utilisé comme outil de recherche innovant pour la compréhension des mécanismes biologiques osseux et le développement de thérapies contre les physiopathologies osseuses.

En parallèle, le projet STREAM, accompagné par la SATT Pulsalys, permet de préparer les opportunités de valorisation industrielle du dispositif pour le développement de thérapies avancées, de stratégies de culture de greffons osseux, ou encore le criblage de molécules ostéo-actives en remplacement des modèles animaux.

Références

Références

- Accuray Research. 2016. Global Organ-On-Chip Market Analysis & Trends - Industry Forecast to 2025. <https://www accurayresearch.com/organ-on-chip-market-analysis-size-share-trends>.
- Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G. 2013. Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 61(1):25-41.
- Akra B, Haas U, Hollweck T; 2013. Method of examining tissue growth and conditioning of cells on a scaffold and a perfusion bioreactor.
- Allied Market Research. 2017. Organ-on-Chip Market by Type (Heart-on-chip, Human-on-chip, Intestine-on-chip, Kidney-on-chip, Liver-on-chip, and Lung-on-chip) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2017-2023. <https://www.alliedmarketresearch.com/organ-on-chip-market>.
- Allori AC, Sailon AM, Clark E, Cretiu-Vasiliiu C, Smay J, Ricci JL, Warren SM. 2008. Dynamic cell culture prevents core necrosis and creates meaningful osteoblastic networks in thick 3D tissue-engineered constructs. *Tissue Engineering Part A* 14(5):840-841.
- Amadeo F, Boschetti F, Polvani G, Banfi C, Pesce M, Santoro R. 2018. Aortic valve cell seeding into decellularized animal pericardium by perfusion-assisted bioreactor. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12(6):1481-1493.
- Arriero MD, Ramis JM, Perello J, Monjo M. 2012. Differential Response of MC3T3-E1 and Human Mesenchymal Stem Cells to Inositol Hexakisphosphate. *Cellular Physiology and Biochemistry* 30(4):974-986.
- Bacabac RG, Smit TH, Cowin SC, Van Loon JJWA, Nieuwstadt FTM, Heethaar R, Klein-Nulend J. 2005. Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers. *Journal of Biomechanics* 38(1):159-167.
- Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. 2003. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Engineering* 9(3):549-554.
- Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20):12600-5.
- Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, Boyan B, Boskey A. 2003. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int* 72(5):537-47.
- Bouet G, Bouleftour W, Juignet L, Linossier MT, Thomas M, Vanden-Bossche A, Aubin JE, Vico L, Marchat D, Malaval L. 2015a. The impairment of osteogenesis in bone sialoprotein (BSP) knockout calvaria cell cultures is cell density dependent. *PLoS One* 10(2):e0117402.
- Bouet G, Cabanettes F, Bidron G, Guignandon A, Peyroche S, Bertrand P, Vico L, Dumas V. 2019. Laser-Based Hybrid Manufacturing of Endosseous Implants: Optimized Titanium Surfaces for Enhancing Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5(9):4376-4385.
- Bouet G, Cruel M, Laurent C, Vico L, Malaval L, Marchat D. 2015b. VALIDATION OF AN IN VITRO 3D BONE CULTURE MODEL WITH PERFUSED AND MECHANICALLY STRESSED CERAMIC SCAFFOLD. *European Cells & Materials* 29:250-267.
- Bouet G, Marchat D, Cruel M, Malaval L, Vico L. 2015c. In Vitro Three-Dimensional Bone Tissue Models: From Cells to Controlled and Dynamic Environment. *Tissue Engineering Part B-Reviews* 21(1):133-156.
- Cancedda R, Cedola A, Giuliani A, Komlev V, Lagomarsino S, Mastrogiacomo M, Peyrin F, Rustichelli F. 2007. Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction. *Biomaterials* 28(15):2505-24.

- Cartmell S, Huynh K, Lin A, Nagaraja S, Guldberg R. 2004. Quantitative microcomputed tomography analysis of mineralization within three-dimensional scaffolds in vitro. *J Biomed Mater Res A* 69(1):97-104.
- Cartmell SH, Porter BD, Garcia AJ, Guldberg RE. 2003. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro. *Tissue Engineering* 9(6):1197-1203.
- Carton M, Santin G, Leclerc A, Gueguen A, Goldberg M, Roquelaure Y, Zins M, Descatha A. 2016. PRÉVALENCE DES TROUBLES MUSCULO-SQUELETTIQUES ET DES FACTEURS BIOMÉCANIQUES D'ORIGINE PROFESSIONNELLE : PREMIÈRES ESTIMATIONS À PARTIR DE CONSTANCES. *Constances : une cohorte française pour la recherche et la santé publique BEH* 35-36:630-639.
- Charbonnier B. 2016. Développement de procédés de mise en forme et de caractérisation pour l'élaboration de biocéramiques en apatites phosphocalciques carbonatées. Mines Saint-Etienne: Thèse de Doctorat de l'Université de LYON. 220 p.
- Charbonnier B, Laurent C, Blanc G, Valfort O, Marchat D. 2016. Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold: Ceramic Architectural Control and Process Limitations. *Advanced Engineering Materials* 18(10):1728-1737.
- Chou YF, Dunn JC, Wu BM. 2005. In vitro response of MC3T3-E1 pre-osteoblasts within three-dimensional apatite-coated PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75(1):81-90.
- Cimons M, Getlin J, Maugh TH. 1998 *Cancer Drugs Face Long Road From Mice to Men*. Los Angeles Times.
- Colaiani G, Cinti S, Colucci S, Grano M. 2017a. Irisin and musculoskeletal health. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1402(1):5-9.
- Colaiani G, Cuscito C, Mongelli T, Oranger A, Mori G, Brunetti G, Colucci S, Cinti S, Grano M. 2014. Irisin Enhances Osteoblast Differentiation In Vitro. *International Journal of Endocrinology*.
- Colaiani G, Cuscito C, Mongelli T, Pignataro P, Buccoliero C, Liu P, Lu P, Sartini L, Di Comite M, Mori G and others. 2015. The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(39):12157-12162.
- Colaiani G, Notarnicola A, Sanesi L, Brunetti G, Lippo L, Celi M, Moretti L, Pesce V, Vicenti G, Moretti B and others. 2017b. Irisin levels correlate with bone mineral density in soccer players. *J Biol Regul Homeost Agents* 31(4 suppl 1):21-28.
- Cooper S, Dick M, Emmot A, Jonak P, Rouleau L, Leask RL. 2012. In Vitro Leukocyte Adhesion in Endothelial Tissue Culture Models Under Flow.
- Costa PFd; 2013. Bioreactor composed of watertight chamber and internal matrix for the generation of cellularized medical implants.
- Coxam V, Davicco MJ, Wittrant Y. 2013. Santé de l'appareil locomoteur : Mécanismes globaux musculo-squelettiques, effets des nutriments. *Innovations Agronomiques* 33:15-24.
- De-Paula MMM, Afewerki S, Viana BC, Webster TJ, Lobo AO, Marciano FR. 2019. Dual effective core-shell electrospun scaffolds: Promoting osteoblast maturation and reducing bacteria activity. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 103.
- De Giglio E, Bonifacio MA, Ferreira AM, Cometa S, Ti ZY, Stanzione A, Dalgarno K, Gentile P. 2018. Multi-compartment scaffold fabricated via 3D-printing as in vitro co-culture osteogenic model. *Scientific Reports* 8.
- Du D, Ushida T, Furukawa KS. 2015. Influence of cassette design on three-dimensional perfusion culture of artificial bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 103(1):84-91.
- European commission. 2019. Animals used for scientific purposes. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/reports_en.htm.
- extremetech. <https://www.extremetech.com/wp-content/uploads/2012/01/microfluidics-chip-bacteria-biopixel.jpg>.

- Ferraro D, Serra M, Ferrante I, Viovy JL, Descroix S. 2018. Microfluidic valve with zero dead volume and negligible back-flow for droplets handling. *Sensors and Actuators B-Chemical* 258:1051-1059.
- Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. 1978. Different Intermediate-Sized Filaments Distinguished by Immunofluorescence Microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(10):5034-5038.
- Freitas D, Almeida HA, Bartolo PJ. 2014. Perfusion bioreactor fluid flow optimization. In: Varajao J, Cunha M, BjornAndersen N, Turner R, Wijesekera D, Martinho R, Rijo R, editors. *Centeris 2014 - Conference on Enterprise Information Systems / Projman 2014 - International Conference on Project Management / Hcist 2014 - International Conference on Health and Social Care Information Systems and Technologies*. p 1238-1247.
- Gaspar DA, Gomide V, Monteiro FJ. 2012. The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter* 2(4):167-75.
- Gerbaix M, Gnyubkin V, Farlay D, Olivier C, Ammann P, Courbon G, Laroche N, Genthial R, Follet H, Peyrin F and others. 2017. Erratum: One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons. *Sci Rep* 7(1):13078.
- Giselbrecht S, Hebeiss I, Schepers U, Truckenmueller R; 2013. Vascular model, method for producing said model and use thereof.
- Gomes ME, Sikavitsas VI, Behravesh E, Reis RL, Mikos AG. 2003. Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67A(1):87-95.
- Goppert-Mayer M. 2009. Elementary processes with two quantum transitions. *Annalen Der Physik* 18(7-8):466-479.
- Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PH, Lennon DP, Caplan AI, Vunjak-Novakovic G. 2008. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng Part A* 14(11):1809-20.
- Grayson WL, Marolt D, Bhumiratana S, Froehlich M, Guo XE, Vunjak-Novakovic G. 2011. Optimizing the Medium Perfusion Rate in Bone Tissue Engineering Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 108(5):1159-1170.
- Hadida M, Marchat D. 2019. Strategy for achieving standardized bone models. *Biotechnol Bioeng*.
- Headen DM, Garcia JR, Garcia AJ. 2018. Parallel droplet microfluidics for high throughput cell encapsulation and synthetic microgel generation. *Microsystems & Nanoengineering* 4. Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. 2005. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Annals of Biomedical Engineering* 33(9):1238-1248.
- Jinnai H, Watahira H, Kajihara T, Nishikawa Y, Takahashi M, Ito M. 2002. Surface curvatures of trabecular bone microarchitecture. *Bone* 30(1):191-4.
- Juignet L. 2016. Effets de la macro-architecture du substrat sur l'activité et la différenciation des ostéoblastes. <http://www.theses.fr/2016LYSES060>: Université Jean Monnet (Saint-Etienne).
- Juignet L, Charbonnier B, Dumas V, Bouleftour W, Thomas M, Laurent C, Vico L, Douard N, Marchat D, Malaval L. 2017. Macrotopographic closure promotes tissue growth and osteogenesis in vitro. *Acta Biomaterialia* 53:536-548.
- Kapfer SC, Hyde ST, Mecke K, Arns CH, Schroder-Turk GE. 2011. Minimal surface scaffold designs for tissue engineering. *Biomaterials* 32(29):6875-6882.
- Kasseck C, Kratz M, Torcasio A, Gerhardt NC, van Lenthe GH, Gambichler T, Hoffmann K, Jones DB, Hofmann MR. 2010. Comparison of optical coherence tomography, microcomputed tomography, and histology at a three-dimensionally imaged trabecular bone sample. *J Biomed Opt* 15(4):046019.
- Kenkre JS, Bassett JHD. 2018. The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry* 55(3):308-327.

- Kilic T, Navaee F, Stradolini F, Renaud P, Carrara S. 2018. Organs-on-chip monitoring: sensors and other strategies. *Microphysiological systems*.
- Kleinhans C, Mohan RR, Vacun G, Schwarz T, Haller B, Sun Y, Kahlig A, Kluger P, Finne-Wistrand A, Walles H and others. 2015. A perfusion bioreactor system efficiently generates cell-loaded bone substitute materials for addressing critical size bone defects. *Biotechnology Journal* 10(11):1727-1738.
- Kodama H. A. AY, Sudo H., Kasai S., Yamamoto S. 1981. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn J Oral Biol.* 23(4):899-901.
- Kurzyk A, Ostrowska B, Swieszkowski W, Pojda Z. 2019. Characterization and Optimization of the Seeding Process of Adipose Stem Cells on the Polycaprolactone Scaffolds. *Stem Cells International*.
- Langhans SA. 2018. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology* 9.
- Levin A, Sharma V, Hook L, Garcia-Gareta E. 2018. The importance of factorial design in tissue engineering and biomaterials science: Optimisation of cell seeding efficiency on dermal scaffolds as a case study. *Journal of Tissue Engineering* 9.
- Li D, Dai K, Tang T. 2008. Effects of dextran on proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 10(6):587-596.
- Li D, Tang T, Lu J, Dai K. 2009. Effects of Flow Shear Stress and Mass Transport on the Construction of a Large-Scale Tissue-Engineered Bone in a Perfusion Bioreactor. *Tissue Engineering Part A* 15(10):2773-2783.
- Liang X, Graf BW, Boppart SA. 2009. Imaging engineered tissues using structural and functional optical coherence tomography. *J Biophotonics* 2(11):643-55.
- Liu BY, Han SY, Hedrick BP, Modarres-Sadeghi Y, Lynch ME. 2018. Perfusion applied to a 3D model of bone metastasis results in uniformly dispersed mechanical stimuli. *Biotechnology and Bioengineering* 115(4):1076-1085.
- Lush Prize. 2014. A Global View of Animal Experiments 2014. https://www.lushprize.org/wp-content/uploads/Global_View_of-Animal_Experiments_2014.pdf.
- Ma HP, Deng X, Chen DY, Zhu D, Tong JL, Zhao T, Ma JH, Liu YQ. 2018. A microfluidic chip-based co-culture of fibroblast-like synoviocytes with osteoblasts and osteoclasts to test bone erosion and drug evaluation. *Royal Society Open Science* 5(9).
- Maes F, Claessens T, Moesen M, Van Oosterwyck H, Van Ransbeeck P, Verdonck P. 2012. Computational models for wall shear stress estimation in scaffolds: A comparative study of two complete geometries. *Journal of Biomechanics* 45(9):1586-1592.
- Maes F, Van Ransbeeck P, Van Oosterwyck H, Verdonck P. 2009. Modeling fluid flow through irregular scaffolds for perfusion bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 103(3):621-30.
- Mahadik BP, Wheeler TD, Skertich LJ, Kenis PJA, Harley BAC. 2014. Microfluidic Generation of Gradient Hydrogels to Modulate Hematopoietic Stem Cell Culture Environment. *Advanced Healthcare Materials* 3(3):449-458.
- Marchat D, Champion E. 2017. Ceramic devices for bone regeneration: mechanical and clinical issues and new perspectives. In: Palmero P, De Barra E, Cambier F, editors. *Advances in Ceramic Biomaterials*: Woodhead publishing, Elsevier. p 500.
- McCoy RJ, Jungreuthmayer C, O'Brien FJ. 2012. Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 109(6):1583-1594.
- McCoy RJ, O'Brien FJ. 2010. Influence of Shear Stress in Perfusion Bioreactor Cultures for the Development of Three-Dimensional Bone Tissue Constructs: A Review. *Tissue Engineering Part B-Reviews* 16(6):587-601.
- McFETRIDGE PS; 2013. Flow chambers, methods of using the flow chamber, and methods of making the flow chamber.

- Melchels FP, Barradas AM, Van Blitterswijk CA, De Boer J, Feijen J, Grijpma DW. 2010a. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. *Acta biomaterialia* 6(11):4208-4217.
- Melchels FP, Bertoldi K, Gabbriellini R, Velders AH, Feijen J, Grijpma DW. 2010b. Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography. *Biomaterials* 31(27):6909-6916.
- Milan JL, Planell JA, Lacroix D. 2009. Computational modelling of the mechanical environment of osteogenesis within a polylactic acid-calcium phosphate glass scaffold. *Biomaterials* 30(25):4219-26.
- Mimetas. Mimetas, the organ-on-a-chip company. <https://mimetas.com/overview-mimetas-applications/human-liver-models>): MIMETAS, J.H. Oortweg 19, Leiden, The Netherlands.
- Montazerian H, Davoodi E, Asadi-Eydivand M, Kadkhodapour J, Solati-Hashjin M. 2017. Porous scaffold internal architecture design based on minimal surfaces: A compromise between permeability and elastic properties. *Materials & Design* 126:98-114.
- Moser C, Bardsley K, El Haj AJ, Alini M, Stoddart MJ, Bara JJ. 2018. A Perfusion Culture System for Assessing Bone Marrow Stromal Cell Differentiation on PLGA Scaffolds for Bone Repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6.
- Moya A. 2016. Stratégies pour améliorer la fonctionnalité des cellules souches multipotentes dérivées du stroma de la moelle osseuse en ingénierie tissulaire Paris: Université Sorbonne-Paris Cité - Université Paris Diderot.
- Organovo. <https://organovo.com/technology-platform/>: Organovo, 6275 Nancy Ridge Drive, Suite 110, San Diego, CA 92121.
- Paie P, Vazquez RM, Osellame R, Bragheri F, Bassi A. 2018. Microfluidic Based Optical Microscopes on Chip. *Cytometry Part A* 93A(10):987-996.
- Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachat S, Braccini A, Wendt D, Barbero A, Jacobi C, Martin I. 2014. Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells from Fresh Bone Marrow in a 3D Scaffold-Based System under Direct Perfusion. *Plos One* 9(7).
- Papadimitropoulos A, Riboldi SA, Tonnarelli B, Piccinini E, Woodruff MA, Hutmacher DW, Martin I. 2013. A collagen network phase improves cell seeding of open-pore structure scaffolds under perfusion. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 7(3):183-191.
- Papadimitropoulos A, Scherberich A, Gueven S, Theilgaard N, Crooijmans HJA, Santini F, Scheffler K, Zallone A, Martin I. 2011. A 3D IN VITRO BONE ORGAN MODEL USING HUMAN PROGENITOR CELLS. *European Cells & Materials* 21:445-458.
- Principi E, Buschiazzo A, Papait A, Castagnola P, Costa D, Pece R, Maric I, Scussolini M, Marini C, Sambuceti G and others. 2019. Anthropometric and glucometabolic changes in an age d mouse model of lipocalin-2 overexpression. *International Journal of Obesity* 43(1):189-201.
- Qian X, Yuan F, Zhimin Z, Anchun M. 2013. Dynamic perfusion bioreactor system for 3D culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells on nanohydroxyapatite/polyamide 66 scaffold in vitro. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 101(6):893-901.
- Qiao X, Nie Y, Ma Y, Chen Y, Cheng R, Yin W, Hu Y, Xu W, Xu L. 2016. Irisin promotes osteoblast proliferation and differentiation via activating the MAP kinase signaling pathways. *Sci Rep* 6:18732.
- Ramos-Vara JA. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 42(4):405-426.
- Rauh J, Milan F, Gunther KP, Stiehler M. 2011. Bioreactor Systems for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B-Reviews* 17(4):263-280.
- Reynolds PM, Rasmussen CH, Hansson M, Dufva M, Riehle MO, Gadegaard N. 2018. Controlling fluid flow to improve cell seeding uniformity. *Plos One* 13(11).
- Salehi-Nik N, Amoabediny G, Pouran B, Tabesh H, Shokrgozar MA, Haghhighipour N, Khatibi N, Anisi F, Mottaghy K, Zandieh-Doulabi B. 2013. Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering. *Biomed Research International*.

- Scheinpflug J, Pfeiffenberger M, Damerou A, Schwarz F, Textor M, Lang A, Schulze F. 2018. Journey into Bone Models: A Review. *Genes (Basel)* 9(5).
- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MA, Dauner M, Mikos AG. 2005. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* 33(1):63-70.
- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. 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(1):136-48.
- Singh YP, Dasgupta S, Bhaskar R. 2019. Preparation, characterization and bioactivities of nano anhydrous calcium phosphate added gelatin-chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*.
- Skardal A, Murphy SV, Devarasetty M, Mead I, Kang HW, Seol YJ, Zhang YS, Shin SR, Zhao L, Aleman J and others. 2017. Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Scientific Reports* 7.
- Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, Zaher W, Mortensen LJ, Alt C, Turcotte R and others. 2014a. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508(7495):269-73.
- Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu JW, Runnels JM, Zaher W, Mortensen LJ, Alt C, Turcotte R and others. 2014b. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508(7495):269-+.
- Spring KR. 2019. Objective Working Distance. In: Nikon, editor. <https://www.microscopyu.com/tutorials/workingdistance>.
- Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. 1983. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96(1):191-8.
- Temiz Y, Delamarche E. 2018. Sub-nanoliter, real-time flow monitoring in microfluidic chips using a portable device and smartphone. *Scientific Reports* 8.
- Tovar-Lopez FJ, Dominguez-Hernandez VM, Diez-Garcia MD, Araujo-Monsalvo VM. 2014. Finite-element analysis of the effect of basic hip movements on the mechanical stimulus within a proximal femur. *Revista De Investigacion Clinica-Clinical and Translational Investigation* 66:S32-S38.
- van den Dolder J, Spauwen PHM, Jansen JA. 2003. Evaluation of various seeding techniques for culturing osteogenic cells on titanium fiber mesh. *Tissue Engineering* 9(2):315-325.
- Vetsch JR, Hofmann S, Müller R. 2015. Perfusion bioreactors for bone tissue engineering - A combined experimental and computational approach [Diss, Eidgenössische Technische Hochschule ETH Zürich, Nr 22998]. 1 Band p.
- Vico L, Hargens A. 2018. Skeletal changes during and after spaceflight. *Nature Reviews Rheumatology* 14(4):229-245.
- Vico L, van Rietbergen B, Vilayphiou N, Linossier MT, Locrelle H, Normand M, Zouch M, Gerbaix M, Bonnet N, Novikov V and others. 2017. Cortical and Trabecular Bone Microstructure Did Not Recover at Weight-Bearing Skeletal Sites and Progressively Deteriorated at Non-Weight-Bearing Sites During the Year Following International Space Station Missions. *J Bone Miner Res* 32(10):2010-2021.
- Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT. 1999. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res* 14(6):893-903.
- Ward K, Fan ZH. 2015. Mixing in microfluidic devices and enhancement methods. *J Micromech Microeng* 25(9).
- Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. 1994. A Model for the Excitation of Osteocytes by Mechanical Loading-Induced Bone Fluid Shear Stresses. *Journal of Biomechanics* 27(3):339-360.

- Wendt D, Stroebel S, Jakob M, John GT, Martin I. 2006a. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology* 43(3-4):481-488.
- Wendt D, Stroebel S, Jakob M, John GT, Martin I. 2006b. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology* 43(3-4):481-8.
- Wittkowske C, Reilly GC, Lacroix D, Perrault CM. 2016. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. *Front Bioeng Biotechnol* 4:87.
- Wuest SL, Richard S, Kopp S, Grimm D, Egli M. 2015. Simulated Microgravity: Critical Review on the Use of Random Positioning Machines for Mammalian Cell Culture. *Biomed Research International*.
- x-cellr8. <https://x-cellr8.com/in-vitro-safety-testing/skin-irritation/>: XCellR8 2019 | Techspace One, Sci-Tech Daresbury, Keckwick Lane, Daresbury, Cheshire, WA4 4AB, UK.
- Yang Y, Dubois A, Qin XP, Li J, El Haj A, Wang RK. 2006. Investigation of optical coherence tomography as an imaging modality in tissue engineering. *Phys Med Biol* 51(7):1649-59.
- Yassin MA, Leknes KN, Pedersen TO, Xing Z, Sun Y, Lie SA, Finne-Wistrand A, Mustafa K. 2015. Cell seeding density is a critical determinant for copolymer scaffolds-induced bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 103(11):3649-3658.
- Yeatts AB, Fisher JP. 2011. Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 48(2):171-181.
- Zhang DD, Bae C, Lee J, Lee J, Jin Z, Kang M, Cho YS, Kim JH, Lee W, Lim SK. 2018. The bone anabolic effects of irisin are through preferential stimulation of aerobic glycolysis. *Bone* 114:150-160.
- Zhou HZ, Weir MD, Xu HHK. 2011. Effect of Cell Seeding Density on Proliferation and Osteodifferentiation of Umbilical Cord Stem Cells on Calcium Phosphate Cement-Fiber Scaffold. *Tissue Engineering Part A* 17(21-22):2603-2613.

Annexe

ANNEXE: rapport d'évaluation du projet ESA BONUS

EVALUATION REPORT

Project Full Title: In vitro and in vivo pre-screening models and services for space and terrestrial interventions against BONE and mUScle fragility
Project Acronym: BONUS
Continuation Proposal: No
Date of Report: February 18, 2019

SCIENTIFIC MERIT

Significance – Does this study address an important problem? If the objectives of the proposal are achieved, how will scientific knowledge and/or technology be advanced? What will be the effect of these studies on the concepts, methods, or products that drive this field?

The project addresses the problem of microgravity induced osteosarcopenia, a well-known problem associated with prolonged space travel. Despite countermeasures, prolonged stays under conditions of microgravity are still associated with loss of both bone and muscle mass. The project has three components: (1) to further study the potential of the peptide irisin in treating and preventing osteosarcopenia, with a focus on its possible role as a pharmacological countermeasure, (2) development of a 3D bioreactor with integrated fluidics and electronics allowing full control and characterization in real time of the evolution of cell cultures (the system, when developed, will be used to test the osteogenic potential of irisin), and (3) to set up an integrated service, offering researchers and companies the possibility to test, in a preclinical setting, the potential of new drug targets for treating osteosarcopenia. Irisin is a newly discovered peptide that, among other effects, influences the remodeling of both muscle and bone. It has potential for treating osteosarcopenic conditions, and the present project will help to clarify this potential. It is less clear, what the significance of the so called integrated service will be. Undoubtedly it could hold some commercial value for the CRO Atlantic Bone Screen, but from a scientific viewpoint, it is less exciting. Most of the proposed assays are well developed in laboratories that work in this field, and it is not clear that this initiative will fill a major unmet need.

The consortium addresses a problem existing on earth for the aging population and for space journeys for astronauts: osteosarcopenia and loss in muscle mass and strength (muscular-skeletal deconditioning). This is a highly interesting project and the research results can help to improve the health situation of the aging population and of astronauts. The model systems suggested are interesting to study these deficiencies on earth and under microgravity conditions and most of all: its treatment.

The proposal addresses a topic which is of high relevance for future space activities such as travel or long term research and also addresses a problem, bone atrophy, the elderly face which is of highest relevance for the world's population. BONUS' primary goal is to investigate the potential of Irisin, which has already proven to be a promising candidate in prior studies, to prevent muscle and bone loss due to exposure to microgravity environment or aging. Furthermore, in vivo and in vitro models will be developed to support future research and to provide test methods for industry.

Score: 28 / 30

Approach – Are the conceptual framework, design, methods and analyses adequately developed, well integrated and appropriate to the aims of the project? Does a flight proposal build upon a successful foundation of ground studies? Is the proposed approach likely to yield the desired results? Does the applicant acknowledge potential problem areas and consider alternative tactics?

The conceptual framework is appropriate for the planned project. The planned approach will shed light on the effects of irisin in cell cultures and in animal models, but the important problem of the human relevance of the observations, will not be touched by the present project.

The project is well organized and brings together five partners from academia and five industry partners (plus associated partners). The organization and governance is obvious and focused to study the model systems and also the effect of the cytokine Irisin for treatment of osteosarcopenia and loss in muscle mass. A promising mouse model is suggested, which can also be used for experiments under micro-gravity. The planning of the workpackages is well performed.

As this is a first time study, methods and test designs are roughly described and do not seem to rely on manifold prior tests. However, the described approach, in general, seems to be appropriate to provide an adequate basis for future tests in a microgravity environment (besides the RPM), which will potentially be approached in a second or third phase of the project. The two main test strategies base on the HLU model and studies in connection with the RPM, which seem to be well developed already and will be adjusted to the needs of the proposed project. Potential problems, in general, are not described and thus alternative tactics are not really respected in the proposal.

Score: 22 / 25

Innovation – Does the project employ novel concepts, approaches or methods? Are the aims original and innovative? Does the project challenge existing paradigms or develop new methodologies or technologies?

Part of the project focusses on the effects of irisin on bone and muscle. This effect of irisin has been reported only recently, and are both original and innovative. There is the possibility that irisin may turn out to be a new treatment for osteosarcopenia, a condition for which we lack efficient treatments today. A 3D bioreactor will be an interesting new device, and as such could be an important development in the device area. It is more difficult to see a major effect of the integrated services, which looks more like a business opportunity for a single company, than real general progress.

The combination of three complementary models to test the osteo-myokine cytokine irisin (and lipocalin-2) is novel and interesting, especially in regard to microgravity experiments and application. These models are “a must” for the project and the cooperation of all partners for the development and characterization are well described and organized. New methodologies and technologies will be developed.

The proposed project relies on already existing test methods and tries to adjust them in order to achieve more precise results: optimization of the RPM test setup to allow 3D cell cultures to be applied; development of a perfusion system able to recapitulate, control and monitor the main biophysical, biochemical, and biomechanical processes that define the in vivo bone environment also in connection with promising and new molecules such as Irisin; development of a perfusion culture system with real time monitoring; adjustment of the HLU model. The project thus aims towards the development of new methodologies and technologies.

Score: 18 / 20

Personnel – Does the scientific team have the appropriate level of experience, are sufficient and appropriate personnel dedicated to the project? Is there satisfactory evidence of the team productivity?

The team is highly qualified within their individual fields, and together they have the expertise needed to carry out the present project. Some of the team members are in the forefront on research on the effects of irisin on bones and muscle, and they have already made important contributions to the field. It does not appear as if the team has worked together before, but the individual team members have all a good productivity.

The expertise of the partners is well documented and extremely well combined for the proposed project. The interdisciplinary team seems to be appropriate in terms of experience. The partners possess experience in the test methods that will be adjusted in the frame of the proposed project. The consortium specifically has long term experience in bone and cell biology. However, while the personnel's experience in regards of bone cell biology is greatly described, one would also expect experts in the area of muscle cell biology. The later may be addressed by a general expertise in cell biology.

Score: 14 / 15

Environment – Does the scientific environment in which the work will be performed contribute to the probability of success? Do the proposed experiments take advantage of unique features of the scientific environment and employ useful collaborative arrangements? Is there evidence of institutional support?

The environment appears to be appropriate, and will definitely contribute to the success of the project. The projects are well integrated, and all appears to make contributions to the common project.

The expertise of the researchers is documented; also the contribution of all teams to the overall aim of the project. Most of the industry partners are well incorporated with their certain expertise into the project consortium.

The project proposal aims towards basic research, refinement and optimization of test setups and analyses. In the proposal, it is described that adequate institutional support is given, as the major test methods, setups and models seem to be state of the art in the consortium's institutions. Thus with the personnel's experience and the already available experience with the proposed tests in the scientific environment it is likely that the proposed work will be successful. Overall, the structure of the consortium appears to be reasonable. Institutional support seems to be adequate based on the provided letters of commitment.

Score: 10 / 10

RESEARCH PLATFORM RELEVANCE

Is the proposal appropriate to the proposed research platforms; i.e., can the objectives and protocol be achieved adequately within the capabilities and constraints of these platforms? For spaceflight platforms, can these experiments not be done on ground or using alternative platforms (with simpler access)?

The project needs microgravity or simulated microgravity, as it has at its goal to develop new countermeasures against microgravity induced osteosarcopenia. The main platform appears to be the random positioning machine, but it may also involve later experiments onboard the ISS.

Yes.

The proposal in its first stage aims towards microgravity experiments in a RPM. As this is will be the "first stage" of the project, experiments in the RPM appear to be adequate. Based on the outcome of the project environments with a higher degree and longer duration of microgravity will be required.

Yes

APPLICATION POTENTIAL

Societal drivers – Can the project outcome contribute to meeting societal challenges (e.g., relating to health, security, energy and mineral resources), assuming a successful further development and implementation? Is the scale of impact local, European or global?

As osteosarcopenia is a common condition during ageing, the results of the project may be directly attributable to an important health issue on ground. Furthermore, the planned integrated service could also be of interest to other groups that plans to develop new drugs in this arena.

The results of this work (Models systems) can easily be used for the improvement of the health situation of an aging population. The scale of impact is a global one.

The project, in case of a successful outcome, will address a topic of highest societal relevance. Aging population faces life quality limiting medical challenges in the late term of life. The proposed project will especially contribute to challenges in connection with bone atrophy. When successful, the project may have a positive impact on the life quality of the elderly. The scale of impact is definitely global. There is no doubt, that in the future, space travelling and long term stays in space will play an important role for mankind. Also in this context, this project may have significant impact.

Score: 36 / 40

Industrial/commercial relevance – Can the gained knowledge be instrumental in developing new materials, processes, products and/or services that would provide a competitive edge to (European) companies? Would it affect a single industry, have broad sectoral impact, or could it create new emerging technologies? What would be the time perspective for that (<5 years, 5–10 years, >10 years)? What could be possible show-stoppers?

If the team is successful in establishing the therapeutic potential of irisin, this could be instrumental in developing new treatments for osteosarcopenia. Provided such drugs were produced in Europe, this could give a competitive edge to European companies. Clearly, if the results fail to support an effect of irisin in humans, this will be the end of the project. This is not an unrealistic outcome, as there are no data showing any effects of irisin in humans. The planned integrative service will be an advantage for the company Atlantic Bone Screen, but is expected that this will be a rather local effect, with no major ramifications on a European or global scale.

The test systems and the basic experiments might lead (not within this project) to a better treatment of the disorders in focus (osteosarcopenia and loss in muscle mass) of this project. The results can be used for a better medical treatment. However, even new pharmaceutical products can be a result of these studies. The biological and mechanical models alone are an interesting tool for studies in the treatment of these diseases.

The proposed project aims towards the development of models and tools for pre-clinical services and a bioreactor for the 3D in vitro bone remodelling. These models may later be used by pharmaceutical, nutrition or food companies willing to evaluate new molecules against bone disorders. However, the impact and relevance in this context appears to be of smaller scale. A positive research outcome on the effects of Irisin as part of a new intervention against bone atrophy will definitely be relevant for industry. Commercial relevance can be expected in a period of 5 to 10 years. A negative outcome regarding the effects of Irisin on the bone atrophy hindering effect may significantly affect this project.

Score: 25 / 30

Take-up – How does the project fit in the (development) strategy of the involved industrial and/or other non-academic partners? How will targeted results be adopted and incorporated in their (research) activities? As appropriate, are routes for protecting IP and commercialisation envisaged? How intense is their anticipated engagement in the project? Are conceivable application areas satisfactorily covered and are they key players in their field?

The project has good industrial support, and the companies express great interest in various parts of the project. Most of the industrial interest centers on the 3D bioreactor and its associated microfluidics. Also the integrated service is highly relevant and suitable for the involved industrial partner. There appears to be patent applications protecting the work around irisin as a treatment for osteosarcopenia, but there is no description of what procedures will be taken to protect the IP rights connected to the other parts of the project. The companies appear to have the necessary expertise, and to be key players in their field.

The interaction within the team is well organized. The governance structure for the research work seems to be clear. The consortium will try to offer the test systems for commercial services (page 39). As far as I see, no information about handling the IP questions is described.

The proposed project, in its early phase, will mainly cover basic research. Additional, industrial partners will definitely be attracted in the later phases of the project. However, even at this early stage, five industrial partners are involved highlighting the relevance of the project even in this early stage. The scope of the partners matches the addressed field of the project. In case the outcome of the project is positive, a translation from research to the market seems to be realistic. The IP seems to be secured by the project partners already.

Score: 26 / 30

EVALUATION OUTCOME (to be completed during consensus meeting)

CRITERION	TOTAL SCORE
Scientific Merit ¹⁾	Outstanding (92)
Research Platform Relevance ²⁾	Yes
Application Potential ¹⁾	Excellent (87)
DISPOSITION³⁾	Acceptable

1) Outstanding = 100–91 points; excellent = 90–81 points; very good = 80–71 points; fair to good = 70–46 points; unacceptable = 45–0 points

2) A positive or negative advice is to be given

3) Proposals have to obtain a “very good” or better for both scientific merit and application potential to qualify for acceptance, as well as a positive assessment with respect to research platform relevance

NNT : *Communiqué le jour de la soutenance*

Mikhael HADIDA

Design of a perfusion culture system for bone tissue models development

Speciality: Mechanics & Engineering

Keywords: Bone, *in vitro* models, perfusion bioreactor, fluid mechanics

Abstract:

Animal models remain the “gold standard” in biology for both fundamental research and drug development. However, these models are also associated with heavy ethical, scientific and economic drawbacks. For those reasons, some biological procedures are headed towards a paradigm shift from animal testing to *in vitro* tissue and organ models. At the time, current bone tissue models remain rudimentary, and the exact influence of culture parameters on cell behavior is still mostly unknown.

This aim of this thesis is the development of an innovating 3D perfused culture system, allowing the controlled, standardized and streamlined production of scaffold-based bone tissue models dedicated to fundamental biology, pharmaceutical and preclinical studies. The manuscript is built around a critical analysis of the literature, the resulting design process and the valorization strategies (patent, European project) developed to ensure the project continuity.

NNT : 2019LYSEM031

Mikhael HADIDA

Développement d'un système de culture perfusé pour l'élaboration de modèles de tissus osseux

Spécialité : Mécanique & Ingénierie

Mots clefs : Os, modèles *in vitro*, bioréacteurs à perfusion, mécanique des fluides

Résumé :

L'utilisation des modèles animaux reste la norme en biologie pour la recherche fondamentale comme pour les tests de nouveaux médicaments, mais présente de lourds désavantages éthiques, scientifiques et financiers. Pour ces raisons, certaines procédures biologiques s'orientent vers un changement de paradigme des modèles animaux vers les modèles *in vitro* de tissus et/ou d'organes miniaturisés générés à partir de cellules humaines. Pour l'heure, les modèles de tissus osseux restent rudimentaires, et l'influence des paramètres de culture sur le comportement cellulaire est globalement inconnue.

Cette thèse a pour objectif de développer un système innovant de culture en trois dimensions perfusé permettant la culture maîtrisée, standardisée et simplifiée de tissus osseux modèles fabriqués *in vitro* sur des supports de culture; exploitable notamment dans le cadre de la biologie exploratoire, de la recherche pharmaceutique ou des études précliniques. Le manuscrit s'articule autour d'une analyse critique de la littérature, de la conception du dispositif de culture et des stratégies de valorisation (brevet, projet européen) mises en place pour assurer la pérennité du projet.