



HAL
open science

Elaboration de modèle 3D par bio-impression pour le suivi des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire : application à l'ostéogenèse imparfaite

Sarah Pragnere

► To cite this version:

Sarah Pragnere. Elaboration de modèle 3D par bio-impression pour le suivi des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire : application à l'ostéogenèse imparfaite. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022ECDL0003 . tel-03998377

HAL Id: tel-03998377

<https://theses.hal.science/tel-03998377>

Submitted on 21 Feb 2023

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.



N° d'ordre NNT : 2022ECDL0003

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de L'Ecole Centrale de Lyon

Ecole Doctorale n°162

Mécanique - Energétique - Génie civil - Acoustique

Spécialité de doctorat : Biomécanique

Soutenue publiquement le 16/09/2022, par :

Sarah PRAGNERE

**Élaboration de modèle 3D par bio-impression pour
le suivi des propriétés mécaniques de la matrice
extracellulaire : application à l'ostéogenèse
imparfaite**

Devant le jury composé de :

Patrick CHABRAND	Professeur des universités, Aix-Marseille Université	Rapporteur
Romain DEBRET	Chargé de recherche, HDR, CNRS	Rapporteur
Fabrice PIROT	PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1	Examinateur
Luciano VIDAL	Chercheur associé, Ecole Centrale de Nantes	Examinateur
Laure-Lise GRAS	Maître de conférences, Université Claude Bernard Lyon 1	Examinatrice
Marie-Alexandrine BOLZINGER	Professeure des universités, Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente du jury
Cyril PAILLER-MATTEI	Professeur des Universités, Ecole Centrale de Lyon	Directeur de thèse
Emma PETIOT	Chargée de recherche, HDR, CNRS	Co-encadrante de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Fabrice Thouverez et M. Jean-Luc Loubet, directeurs successifs du LTDS, de m'avoir accueillie au sein du LTDS. Merci à Christophe Marquette de m'avoir introduit au sein de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS.

Ensuite, je remercie M. Patrick Chabrand et M. Romain debret d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je remercie également M. Luciano Vidal, M. Fabrice Pirot, Mme Laure-Lise Gras et Mme Marie-Alexandrine d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je voudrais également remercier M. Jean-Pierre Bertoglio et M. Hassan Zahouani pour le soutien financier qu'ils ont apporté à mon projet.

Merci à M. Jocelyn Bonjour et M. Alain Le Bot d'avoir été présent quand cela a été nécessaire.

Je voudrais maintenant remercier chaleureusement mes encadrants pour m'avoir accompagné tout au long de ce projet. Merci infiniment Cyril et Emma pour votre patience et votre bienveillance. Pour reprendre tes mots Cyril, on ne s'est pas choisi mais on s'est bien trouvé. Si j'ai la chance d'encadrer des doctorants un jour, j'essaierai de leur apporter autant que ce que vous m'avez apporté.

Ce projet a également bénéficié du soutien de personnes extérieures au laboratoire. Je pense notamment au Pr. Roland Chapurlat et à Blandine Merle qui m'ont permis de déposer le dossier CPP pour l'étude sur les patients OI. Blandine, j'ai fortement apprécié ton soutien et les heures que tu as passées sur ce dossier. Je pense également à Mme Amélie Thépot et M. Morgan Dos de LabSkin Creations qui ont apporté leur connaissance et leur expérience à ce projet. Et un grand à Marie-Océane d'avoir passé toute la journée avec moi pour faire de l'indentation sur les peaux reconstruites.

J'ai également eu la chance de rencontrer Mme Marianna Peroglio. Merci pour tes conseils techniques sur les ostéoblastes et tes discussions sur la carrière de chercheur. J'espère que nos chemins se recroiseront.

J'exprime également toute ma gratitude à tous mes collègues du LTDS et de l'ICBMS pour m'avoir rendu la vie plus douce pendant ces quelques années. Merci de m'avoir fait sourire, de m'avoir fait rire, de m'avoir écoutée râler et de m'avoir réconfortée. Et merci d'avoir goûté tous mes gâteaux un peu étranges. Tout particulièrement merci à Laura,

d'avoir mis Ozone dans le P2 avec moi et de m'avoir fait découvrir le Krav Maga.

A Thierry et Cécile, pour m'avoir initiée à la recherche et pour m'avoir toujours soutenue, même de loin. J'ai eu énormément de chance de croiser votre chemin.

Et pour terminer, bien évidemment, je voudrais remercier ma famille. Ceux grâce à qui je suis arrivée jusque là, ceux qui ont toujours cru en moi, même quand moi je n'y croyais plus. Tout particulièrement, merci à Kyâne, pour ta patience infinie et pour continuer à partager mon quotidien hors de France pour la suite.

Bref, du fond du coeur, merci à tout ceux qui ont contribué à ce que j'en sois là aujourd'hui.

Table des matières

Table des figures	vii
Liste des tableaux	xi
Introduction	1
1 Bibliographie	4
Introduction	4
1.1 L'os	4
1.1.1 Biologie de l'os	4
1.1.2 Les propriétés mécaniques du tissu osseux	17
1.1.3 Les modèles d'os <i>in vitro</i>	18
1.2 La peau	30
1.2.1 Composition et organisation de la peau	30
1.2.2 Le processus de cicatrisation	31
1.2.3 les propriétés mécaniques de la peau	34
1.2.4 Les modèles de peau <i>in vitro</i>	34
1.3 L'ostéogenèse imparfaite	38
1.3.1 Qu'est-ce que l'ostéogenèse imparfaite ?	38
1.3.2 Les conséquences de la pathologie sur l'os : de la protéine à l'organe	41
1.3.3 Modèles d'étude de l'ostéogenèse imparfaite	44
Conclusion et objectifs	55
2 Protocoles	58

2.1	Cultures cellulaires	58
2.1.1	Modèles de tissus osseux	58
2.1.2	Modèles de derme	60
2.1.3	Induction et observation des ostéoblastes en ostéocytes	61
2.2	Bio-fabrication par moulage ou bio-impression	61
2.2.1	Préparation de la bio-encre	61
2.2.2	Moulage	62
2.2.3	Bio-impression	62
2.2.4	Réticulation	63
2.2.5	Maturation des construits	63
2.3	Suivi des cultures 3D	65
2.3.1	Contraction des construits par analyse macroscopique	65
2.3.2	Viabilité et prolifération	65
2.3.3	Métabolisme du lactate	66
2.3.4	Histologie	67
2.3.5	Microscopie électronique à transmission	70
2.3.6	Dosage de la phosphatase alcaline	70
2.3.7	Caractérisation mécanique	73
2.4	Analyse des données	78
3	Caractérisation mécanique multi-échelle des hydrogels acellulaires : effet des conditions de réticulation	79
	Introduction	79
3.1	Effet des conditions de réticulation sur l’aspect macroscopique des hydrogels	82
3.2	Effets des conditions de réticulation sur les propriétés mécaniques	84
3.2.1	Échelle macroscopique : analyse mécanique dynamique (DMA)	84
3.2.2	Echelle mésoscopique : micro-indentation	84
3.2.3	Echelle nanométrique : microscopie à force atomique (AFM)	88
3.2.4	Discussion	90
3.3	Effet des conditions de réticulation sur la structure interne des hydrogels	93

Conclusion	98
4 Développement d'un modèle de tissu osseux <i>in vitro</i>	101
Introduction	101
4.1 Impact du procédé de bio-fabrication	104
4.2 Sélection du modèle cellulaire	106
4.2.1 Comparaison des capacités de prolifération et de différenciation des cellules ostéoblastiques en deux dimensions	106
4.2.2 Comparaison du comportement des MC3T3 et des ostéoblastes primaires dans les construits bio-imprimés	109
4.3 Effet de la micro-porosité et des propriétés mécaniques des construits sur la physiologie cellulaire	115
4.3.1 Impact de l'osmolalité sur la prolifération et la minéralisation des cellules	115
4.3.2 Effet de la micro-porosité et des propriétés mécaniques des construits sur la physiologie cellulaire	117
4.3.3 Discussion générale	133
Conclusion	135
5 Influence des propriétés mécaniques des construit sur les modèles de derme <i>in vitro</i>	139
5.1 Impact des solutions de réticulation sur la prolifération des fibroblastes . .	141
5.2 Effets des propriétés mécaniques et structurales des construits sur le com- portement des fibroblastes	141
5.2.1 Prolifération et répartition des cellules	142
5.2.2 Phénotype des fibroblastes	143
5.2.3 Sécrétion de matrice extracellulaire par les fibroblastes	146
5.2.4 Discussion générale	149
6 Caractérisation mécanique des construits cellularisés	153
Introduction	153
6.1 Propriétés mécaniques des construits : essai d'indentation	153
6.1.1 Analyse des propriétés élastiques des construits	154

6.1.2	Analyse des propriétés viscoélastiques des construits	162
6.1.3	Discussion	167
6.2	Quantification des forces de contraction des cellules	168
	Conclusion	191
7	Développement de modèles cellulaires porteurs d'une mutation associée à l'ostéogenèse imparfaite	192
	Introduction	192
7.1	Obtention de cellules de patient : mutation spontanée	194
7.2	Edition génétique : mutation induite	196
7.2.1	Sélection de la mutation et de la stratégie d'édition génétique	196
7.2.2	Édition génétique d'une cellule de la lignée ostéoblastique	199
7.2.3	Édition génétique d'une cellule de lignée de fibroblaste	205
	Conclusion	210
	Conclusion	211
	Résumé	
	Abstract	

Table des figures

1	Méthodologie générale	3
1.1	Organisation multi-échelle de l'os	5
1.2	Os cortical et os trabéculaire	5
1.3	Os tissé et os lamellaire	6
1.4	Structure et organisation du collagène I	7
1.5	Différenciation des ostéoblastes	9
1.6	Ostéocytes observés en microscopie électronique à balayage	10
1.7	Remodelage dans l'os trabéculaire et dans l'os cortical	13
1.8	Les étapes du remodelage	14
1.9	Minéralisation des fibres de collagène	15
1.10	Ossification endochondrale	16
1.11	Réparation de fracture	17
1.12	Procédure d'isolation d'ostéoblastes primaires	19
1.13	Protocole d'isolation d'ostéocytes humains	22
1.14	Bio-fabrication d'hydrogel	26
1.15	Représentation en coupe de la peau humaine	31
1.16	Organisation des fibres élastiques dans la peau	31
1.17	Les phases de cicatrisation de la peau.	32
1.18	Manifestations cliniques de l'OI	39
1.19	Synthèse et assemblage des fibrilles de collagène.	42
1.20	Conséquences des mutations génétiques sur la structure de la protéine de collagène	43

1.21	Os cortical OI et contrôles reconstruit par tomographie à rayons X	45
1.22	Édition génétique par CRISPR/Cas9	53
1.23	Problématiques abordées	57
2.1	Fonctionnement réactionnel du dosage du lactate	66
2.2	Préparation des échantillons pour les analyses histologiques	67
2.3	Principe de marquage par immunohistochimie	68
2.4	Binarisation des images en microscopie électronique	71
2.5	Principe de fonctionnement de la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie	72
2.6	Principe de fonctionnement réactionnel du dosage de l'ALP	73
2.7	Signaux de contraintes et de déformations durant une stimulation sinusoïdale	74
2.8	Modèle de Maxwell	74
2.9	Principe de fonctionnement d'un essai d'indentation	76
2.10	Dispositif d'indentation utilisé pour la caractérisation mécanique	77
2.11	Principe de fonctionnement de l'AFM	78
3.1	Réticulation des construits bio-imprimés	81
3.2	Aspect macroscopique des hydrogels acellulaires	83
3.3	Comparaison des essais de DMA pour les trois conditions	85
3.4	Correction des effets d'adhésion entre les construits et l'indenteur	86
3.5	Résultats des essais de micro-indentation	87
3.6	Spectroscopie de force par AFM	89
3.7	Observation des construits bio-imprimés en microscopie électronique à transmission	94
3.8	Confirmation de la présence de cristaux de minéralisation par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX)	96
3.9	Quantification de la porosité et du degré d'alignement des réseaux d'alginate et de gélatine	97
3.10	Propriétés mécaniques et structurales des construits bio-imprimés.	100
4.1	Étapes de la différenciation ostéogénique et marqueurs associés	103

4.2	Suivi de la prolifération et de la répartition des cellules dans les construits	104
4.3	Comparaison de la morphologie et de la répartition des ostéoblastes dans les construits moulés ou bio-imprimés	106
4.4	Comparaison des morphologies et de la capacité de minéralisation de différentes sources de cellules potentielles pour la réalisation de modèles osseux <i>in vitro</i>	108
4.5	Suivi de la prolifération et de la répartition des MC3T3 et HOB dans les construits	112
4.6	Répartition des MC3T3 dans les construits	113
4.7	Expression du marqueur PHEX spécifique des ostéocytes après 33 jours de maturation	113
4.8	Comparaison des phénotypes contractiles des MC3T3 et des HOB	114
4.9	Influence des propriétés mécaniques des construit sur les modèles <i>in vitro</i> de tissus osseux	116
4.10	Impact de l'osmolalité des solutions de polymérisation sur la prolifération des HOB	119
4.11	Cinétique de prolifération et de la répartition des cellules dans les construits	120
4.12	Cinétique de contraction des construits au cours de la maturation	121
4.13	Sécrétion de matrice organique par les ostéoblastes primaires	123
4.14	Observation de la matrice par microscopie électronique à transmission	125
4.15	Comparaison de la morphologie des cellules	127
4.16	Expression du marqueur PHEX spécifique des ostéocytes	128
4.17	Métabolisme des ostéoblastes primaires	130
4.18	Activité de l'ALP intracellulaire	132
4.19	Synthèse des paramètres explorés pour l'obtention d'un modèle de tissu osseux <i>in vitro</i> bio-imprimable	138
5.1	Influence des propriétés mécaniques des construit sur les modèles de derme <i>in vitro</i>	140
5.2	Impact des solutions de réticulation sur les fibroblastes : suivi longitudinal de la confluence	141
5.3	Suivi de la prolifération et de la répartition des fibroblastes dans les construits	142
5.4	Répartition des fibroblastes dans les construits après 33 jours de maturation	144

5.5	Comparaison de la morphologie des fibroblastes	145
5.6	Cinétique de contraction des construits	146
5.7	Expression des fibres d' α -SMA dans les fibroblastes des construits après 33 jours de maturation	147
5.8	Expression de la fibronectine et du collagène I dans les construits après 33 jours de maturation	148
6.1	Modules d'élasticité calculés par un ajustement de la courbe expérimentale de force en fonction du déplacement sur les portions de charge ou de décharge et à partir de la raideur de contact.	156
6.2	Comparaison des modules d'élasticité corrigés par prise en compte de l'effet du substrat.	159
6.3	Comparaison des courbes de force expérimentales et théoriques en fonction du déplacement à J33	160
6.4	Représentation du modèle SLS	163
6.5	Fit des courbes d'indentation par un modèle viscoélastique	166
7.1	Stratégies d'obtention de cellules porteuses d'une mutation associée à l'OI	193
7.2	Déroulement prévu de l'étude sur des patients OI et contrôles.	195
7.3	Étapes de production d'un modèle cellulaire OI par édition génétique . . .	197
7.4	Méthode de tri cellulaires des cellules mutées	201
7.5	Caractérisation des Y201 en 2D	202
7.6	Caractérisation du comportement des Y201 dans les construits bio-imprimés	203
7.7	Caractérisation du comportement des BJ-5ta en 2D	206
7.8	Caractérisation du comportement des BJ-5ta dans les construits bio-imprimés	207

Liste des tableaux

1.1	Module d'élasticité de l'os cortical et trabéculaire	17
1.2	Principales lignées d'ostéoblastes	21
1.3	Lignées d'ostéocytes existantes.	24
1.4	Modèles <i>in vitro</i> de tissus osseux bio-imprimés	28
1.5	Modèles <i>in vitro</i> de tissus osseux dans des hydrogels de collagène	29
1.6	Modules d'élasticité de la peau	34
1.7	Modèles de peau <i>in vitro</i> caractérisés mécaniquement	37
1.8	Classification de l'OI	40
1.9	Modèles animaux porteurs de mutations uniquement sur colla1 ou colla2 (OI I – IV)	46
1.10	Études <i>in vitro</i> de cellules porteuses d'une mutation associée à l'OI.	50
1.11	Cellules modifiées par CRISPR/Cas9 pour porter une mutation génétique associée à l'OI	54
2.1	Cellules utilisées pour les modèles de tissus osseux	59
2.2	Cellules utilisées pour les modèles de derme.	60
2.3	Conditions de culture des construits moulés ou bio-imprimés	64
2.4	Anticorps utilisés et protocole de démasquage	69
3.1	Synthèse des caractérisations mécaniques et structurales des construits acellulaires.	99
4.1	Capacité de prolifération et de différenciation des cellules utilisées pour la génération de modèles <i>in vitro</i> de tissus osseux	107

6.1	Valeurs de n obtenues à partir de l'ajustement des données expérimentales de force en fonction du déplacement obtenues sur les construits avec les ostéoblastes	155
6.2	Valeurs de n obtenues à partir de l'ajustement des données expérimentales de force en fonction du déplacement obtenues sur les construits avec les fibroblastes	155
6.3	Somme des résidus entre les données expérimentales et les données ajustées des courbes de force des construits avec les ostéoblastes avec ou sans correction de l'effet du substrat.	158
6.4	Somme des résidus entre les données expérimentales et les données ajustées des courbes de force des construits avec les fibroblastes avec ou sans correction de l'effet du substrat.	161
6.5	Paramètres élastiques et viscoélastiques des construits TG _B Ca ensemencés avec les ostéoblastes.	165
7.1	Mutations génétiques associées à l'OI portées par <i>COL1A1</i> ou <i>COL1A2</i> sélectionnées pour le développement de modèles cellulaires.	197
7.2	Vérification du respect des critères essentiels pour l'introduction d'une mutation génétique ponctuelle.	198
7.3	Comparaison du comportement des cellules de la lignée Y201 et des ostéoblastes primaires dans les construits bio-imprimés.	204
7.4	Comparaison du comportement des cellules de la lignée BJ-5ta et des fibroblastes primaires dans les construits bio-imprimés.	207
7.5	Résultats du séquençage des événements génétiques et impact prédit sur la protéine par les analyses bio-informatiques.	209

Introduction

Le collagène est une protéine de la matrice extracellulaire présente chez toutes les espèces animales, de la méduse jusqu'à l'être humain [1, 2]. A ce jour, 28 types différents de collagène ont été identifiés, classés selon leur structure supramoléculaire en collagènes fibrillaires et non-fibrillaires [3]. Les collagènes fibrillaires consistent en un assemblage structuré de molécules pour former des fibrilles. L'organisation des fibrilles en faisceau procurent des propriétés biomécaniques spécifiques à chaque tissu vivant [3].

Ce travail s'intéresse au collagène fibrillaire, et plus précisément au collagène de type I. Il s'agit de la protéine la plus abondante de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs [1], notamment dans l'os et dans la peau où il représente respectivement 90 % et 70 % de la matrice organique [4, 5]. Le collagène de type I est composé de deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$, encodées par deux gènes différents. Certaines mutations génétiques portées par ces gènes sont à l'origine de pathologies.

Parmi ces pathologies du collagène, l'ostéogénèse imparfaite (OI), communément appelée "maladie des os de verre", est une maladie génétique rare caractérisée par une fragilité accrue des os. A l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'est disponible pour les patients atteints de cette pathologie. Bien que la peau soit également riche en collagène I, les effets des mutations responsables de l'OI sont mineurs sur cet organe.

Afin de décrire les mécanismes moléculaires sous-jacents de cette pathologie, plusieurs études se sont intéressées au comportement des cellules sécrétrices de collagène I. Des cellules de patients ont notamment été extraites de tissus osseux, directement impliqués dans la pathologie, et de peau, plus facile d'accès. Il semble que le comportement *in vitro* des cellules osseuses est plus affecté par la pathologie que celui des cellules de peau, ce qui confirme les observations réalisées *in vivo*. En revanche, certaines caractéristiques physiologiques des cellules osseuses OI, comme leur prolifération, diffèrent entre les observations *in vitro* et *in vivo*. Cela peut s'expliquer par le fait que les études *in vitro* ont été réalisées dans un environnement en deux dimensions, alors que les cellules évoluent *in vivo* dans un environnement en trois dimensions. En effet, de nombreuses études ont montré que le comportement des cellules en deux dimensions n'était pas représentatif du comportement en trois dimensions [6]. Il est donc nécessaire de développer des modèles *in vitro* en trois dimensions pour étudier la pathologie et mieux la comprendre.

Ce travail s'inscrit au cœur d'un projet consistant à établir un lien entre les effets de l'ostéogenèse imparfaite sur le tissu osseux et sur le tissu dermique. Cette étude nécessite de décrire ces tissus d'un point de vue biomécanique et physiologique. La physiologie cellulaire est fortement impactée par le micro-/macro-environnement cellulaire, et notamment les propriétés biomécaniques de la matrice extracellulaire et ses stimuli envers les cellules. Il est donc stratégique et plus pertinent d'étudier la physiologie cellulaire dans un contexte tri-dimensionnel.

Je propose donc dans mon travail de thèse de développer des modèles d'étude *in vitro* en trois dimensions pour les tissus osseux et cutanés. En effet, cette étape est indispensable à la compréhension du lien os-peau dans le cas de l'OI. La génération de ce type de modèle nécessite aussi d'adapter les méthodes de caractérisation biomécanique existantes pour les explants sur ce nouveau type de modèles.

Cette étude se compose de sept chapitres (figure 1). Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique décrivant la structure, la composition et les propriétés mécaniques des tissus riches en collagène I que sont la peau et les os. Nous présenterons également les différents modèles *in vitro* existants. L'ensemble des protocoles utilisés pour ces travaux seront présentés dans le deuxième chapitre. Le troisième chapitre abordera le développement d'hydrogels bio-imprimables aux propriétés mécaniques et structurales modulables. L'impact de ces propriétés sur le développement de modèles *in vitro* de tissu osseux et de derme seront présentés dans les chapitres quatre et cinq. Ensuite, les caractérisations mécaniques des modèles *in vitro* d'os et de derme en lien avec la production de matrice extracellulaire seront abordées dans le sixième chapitre. Nous y évaluerons également les forces de contraction générées par les cellules. Enfin, les stratégies utilisées pour développer des modèles cellulaires porteurs de l'ostéogenèse imparfaite seront décrites dans le septième chapitre.

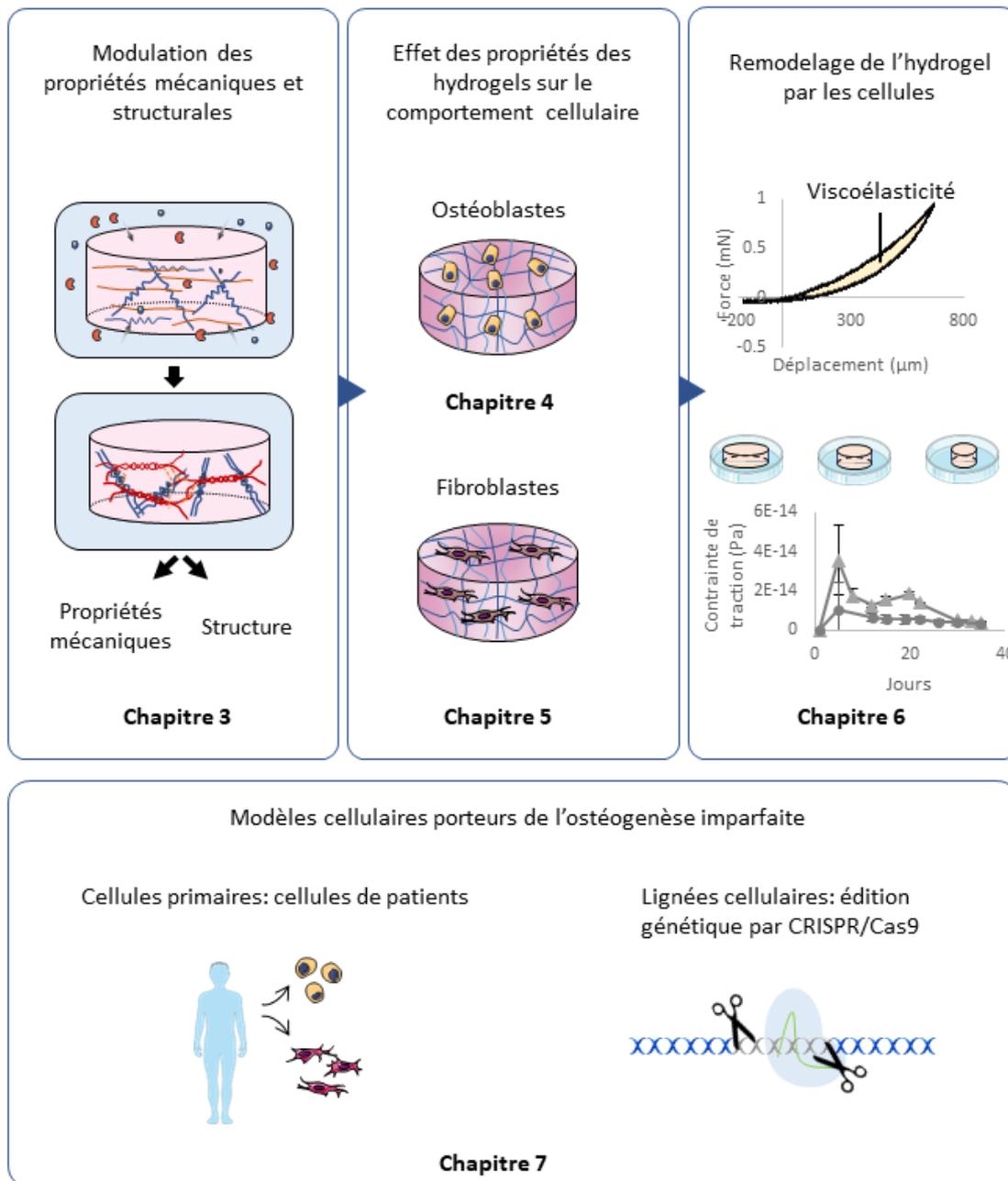


FIGURE 1 – Méthodologie adoptée pour répondre pour produire et caractériser des modèles *in vitro* de tissus osseux et dermiques OI.

Chapitre 1

Bibliographie

Introduction

Dans ce premier chapitre, nous décrirons l'organisation et la composition des tissus d'intérêt de cette thèse, l'os et la peau. Les spécificités de chaque tissu nous permettront de mieux comprendre les enjeux associés au développement de chacun des modèles *in vitro*. Cela nous amènera à un état de l'art des modèles *in vitro* existants pour ces deux tissus. Enfin, les causes et les conséquences de l'ostéogenèse imparfaite seront présentées.

1.1 L'os

1.1.1 Biologie de l'os

1.1.1.1 Organisation multi-échelle : de l'organe à la molécule

Le squelette est une charpente constituée de 206 os qui assure plusieurs fonctions. Premièrement, il offre une protection des organes mous ainsi qu'une structure rigide nécessaire au mouvement. Les os servent également de réserve de minéraux et assurent la production de cellules sanguines dans la moelle osseuse [7]. L'os présente une structure multi-échelle largement décrite dans la littérature [8] (figure 1.1).

Les os sont des organes composés de deux tissus à l'organisation bien distinctes : l'os cortical et l'os trabéculaire (figure 1.2). Ceci leur confère par conséquent des propriétés mécaniques spécifiques. Les proportions d'os cortical et d'os trabéculaire varient suivant les os : 25/75 dans les vertèbres, 50/50 dans la tête fémorale et 95/5 dans la diaphyse (partie centrale et longue) des os longs [7].

L'os cortical est un tissu qui se retrouve principalement dans la diaphyse des os longs et en couche fine à l'extérieur des os plats. Il est recouvert à l'intérieur par l'endosteum et à l'extérieur par le periosteum [9]. Il représente 80 % de la masse du squelette et

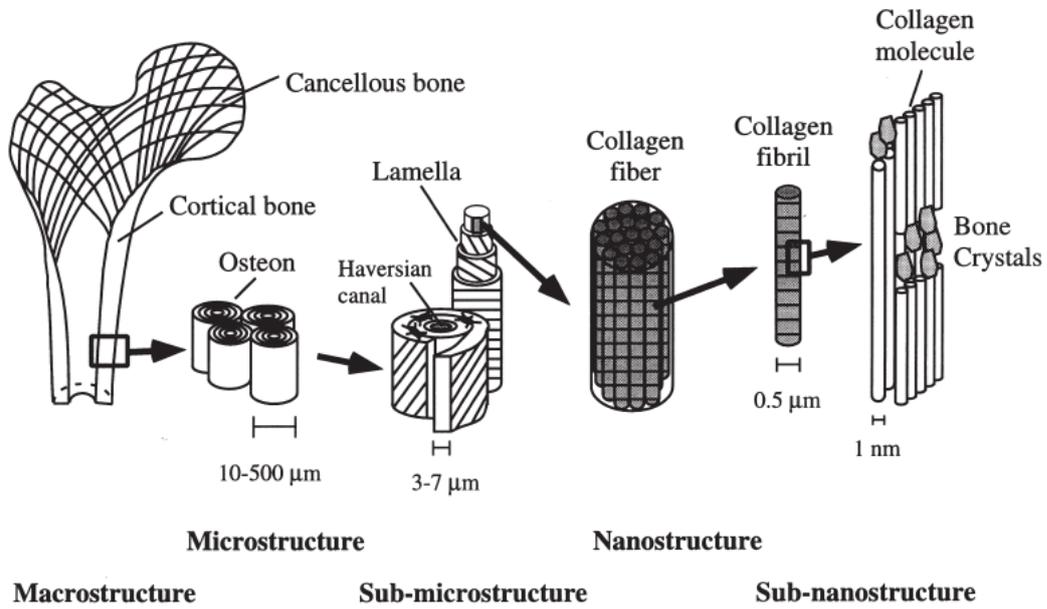


FIGURE 1.1 – Organisation multi échelle de l'os [8]

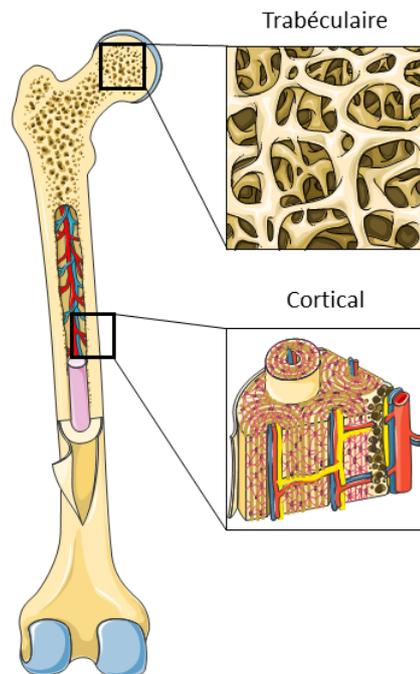


FIGURE 1.2 – Fémur composé d'os trabéculaire dans la tête fémorale et d'os cortical dans la diaphyse.

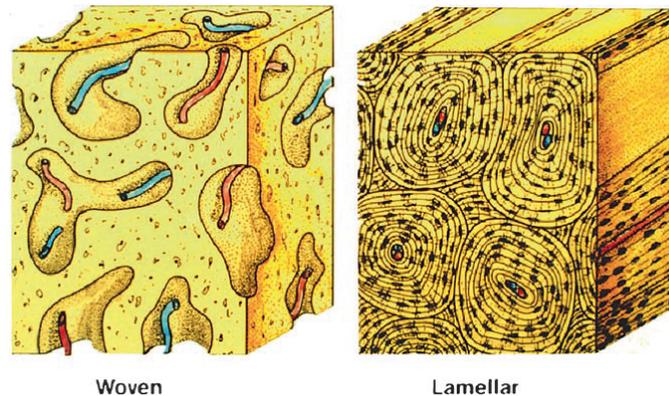


FIGURE 1.3 – Os tissé (*woven*) et lamellaire (*lamellar*) [9].

est majoritairement responsable de la fonction de support de l'os [10]. Il forme un tissu compact avec une porosité d'environ 10 % [11].

L'os cortical peut avoir deux organisations (figure 1.3). La première est appelée os tissé (*woven bone* en anglais) et correspond à un dépôt de fibres de collagène orientées de manière aléatoire. Ce tissu est riche en cellules. Il se retrouve majoritairement chez le fœtus et dans les zones de l'os où la matrice est déposée rapidement, par exemple en cas de réparation de fracture. L'autre organisation est appelée lamellaire car les fibres de collagène sont déposées de manière orientée, formant ainsi des lamelles concentriques autour d'un canal central appelé canal de Havers. L'ensemble des lamelles concentriques et du canal de Havers forment un ostéon. Le canal de Havers abrite les vaisseaux sanguins ainsi que les nerfs. Cette organisation est majoritaire dans l'os adulte [9].

Le tissu trabéculaire est aussi appelé tissu spongieux à cause de sa porosité élevée (40 à 90 %) [12]. Il possède également une structure lamellaire mais contrairement à l'os cortical, il est formé de travées osseuses de 0,2 à 0,4 mm d'épaisseur, séparées par des cavités de moelle osseuse. L'irrigation sanguine se fait par des échanges via les canaliculi qui relient les lacunes ostéocytaires et communiquent avec la moelle osseuse et le tissu adipeux. De ce fait, il représente une surface d'échange considérable avec les liquides interstitiels, ce qui lui procure un renouvellement 9 fois plus rapide que celui de l'os cortical, jouant ainsi un rôle majeur dans l'équilibre phosphocalcique [9]. Ce tissu se retrouve dans les extrémités des os longs où sa structure poreuse permet d'absorber les chocs [8].

La matrice osseuse qui compose l'os cortical et l'os trabéculaire est formée de 50 à 70 % (m/m) de minéral sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), 20 à 40 % de matrice organique (dont 90 % de collagène I et 10 % de protéines non collagéniques [5]) et 5 à 10 % d'eau [7]. Le minéral procure la rigidité et la résistance à la charge alors que la matrice organique procure l'élasticité et la flexibilité [13].

Le collagène I est donc la protéine majoritaire présente dans la matrice organique osseuse. Les molécules de collagène I sont des hétérotrimères constituées de deux chaînes

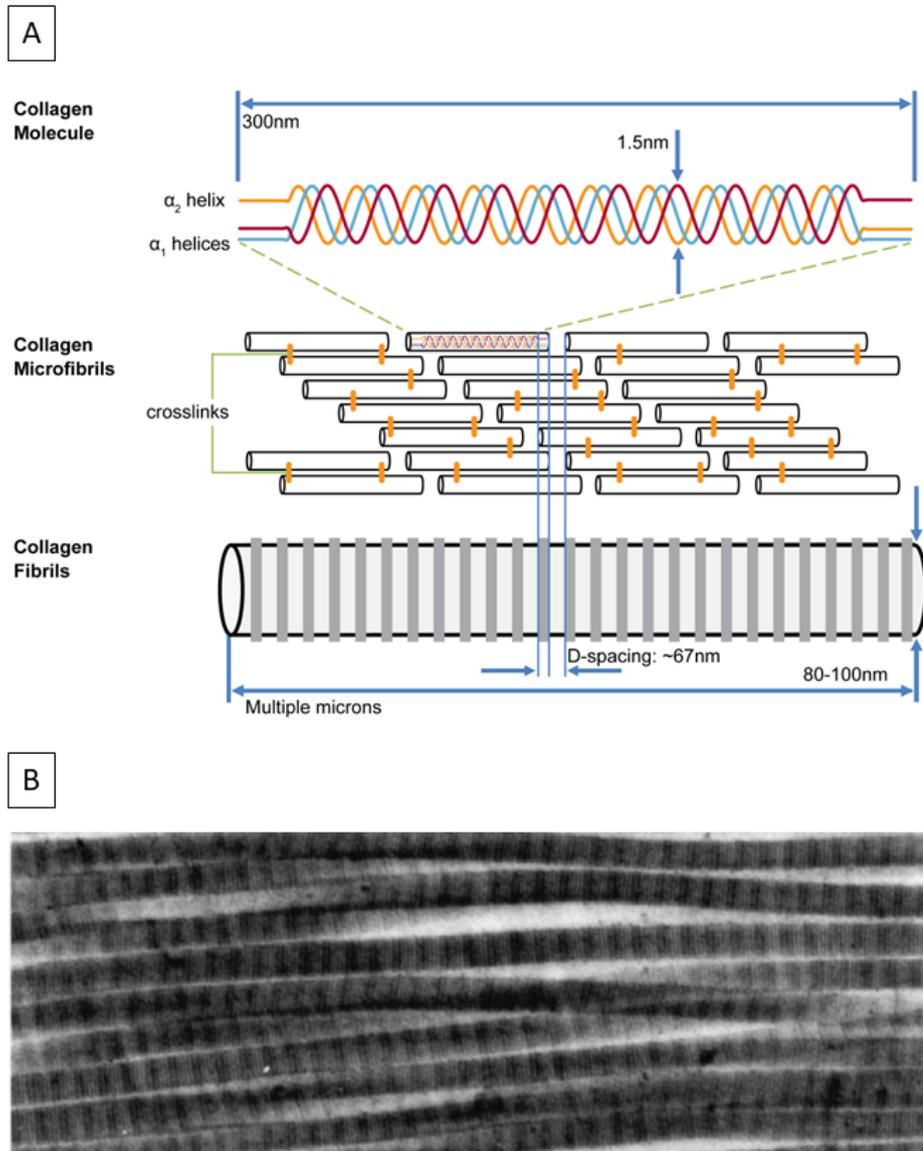


FIGURE 1.4 – Structure et organisation du collagène I. A : Assemblage des fibrilles de collagène [14]. B : Fibrilles de collagène observées en microscopie électronique à transmission [15].

$\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$ qui s'enroulent pour former une triple hélice (figure 1.4). Les molécules mesurent 300 nm de long et 1,5 nm de diamètre. Elles s'arrangent de manière parallèle entre elles mais avec un décalage de 67 nm et un espace de 40 nm entre deux molécules consécutives pour former des fibrilles [1]. Cet arrangement des molécules est responsable de l'aspect strié des fibrilles et de la périodicité de 67 nm [16].

1.1.1.2 Les cellules du tissu osseux

Les cellules osseuses proviennent de deux groupes différents de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques qui vont donner les cellules sanguines et immunitaires, dont les monocytes à l'origine de la lignée ostéoclastique, et les cellules stromales mésenchymateuses qui sont capables de se différencier en adipocytes et cellules de la lignée ostéoformatrice (ostéoblastes et chondroblastes).

a) Les ostéoblastes et ostéocytes

Les cellules de la voie ostéoblastique forment un ensemble de cellules à différents stades de différenciation qui sont responsables d'une large gamme de fonctions. En plus de réguler la formation et la résorption osseuse, elles produisent aussi des facteurs de communication autocrine et paracrine pour la régulation du tissu osseux, ainsi que des hormones circulantes [17].

Les ostéoblastes dérivent des cellules stromales mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse (figure 1.5). Une fois que les ostéoblastes ont synthétisé la matrice osseuse non minéralisée, appelée ostéoïde, ils peuvent avoir trois destins : s'intégrer dans la matrice extracellulaire et poursuivre leur différenciation en ostéocytes, se différencier en cellules bordantes inactives en surface, ou bien mourir par apoptose [18]. La proportion de cellules qui suit chaque voie dépend de l'espèce, de l'âge, du type d'os et du statut hormonal ou pathologique [19, 20]. Selon Parfitt *et al* [21], 50 à 70 % des ostéoblastes meurent par apoptose. Les mécanismes de différenciation responsables de l'engagement d'une cellule dans une voie plutôt qu'une autre ne sont pas encore bien compris [18].

Pour caractériser un stade de différenciation, il faut considérer l'expression de multiples facteurs [22]. Lian et Stein [23] distinguent 3 grandes séquences temporelles avec des expressions de gènes spécifiques : prolifération (10 à 12 jours), développement de la matrice extracellulaire (10 à 15 jours) et minéralisation de la matrice (15 à 20 jours). Pendant la phase de prolifération, l'expression de gènes associés à la synthèse de la matrice extracellulaire diminue jusqu'à un niveau basal. La détection immuno-histochimique de la phosphatase alcaline (ALP) est un des marqueurs les plus précoces de la différenciation en ostéoblastes. La minéralisation de la matrice démarre après sa sécrétion.

Les ostéocytes correspondent au stade de différenciation terminal des ostéoblastes et représentent 90 % de la population cellulaire osseuse. Ces cellules sont intégrées dans la matrice osseuse au sein d'un réseau lacuno-canaliculaire. Le corps des cellules est situé

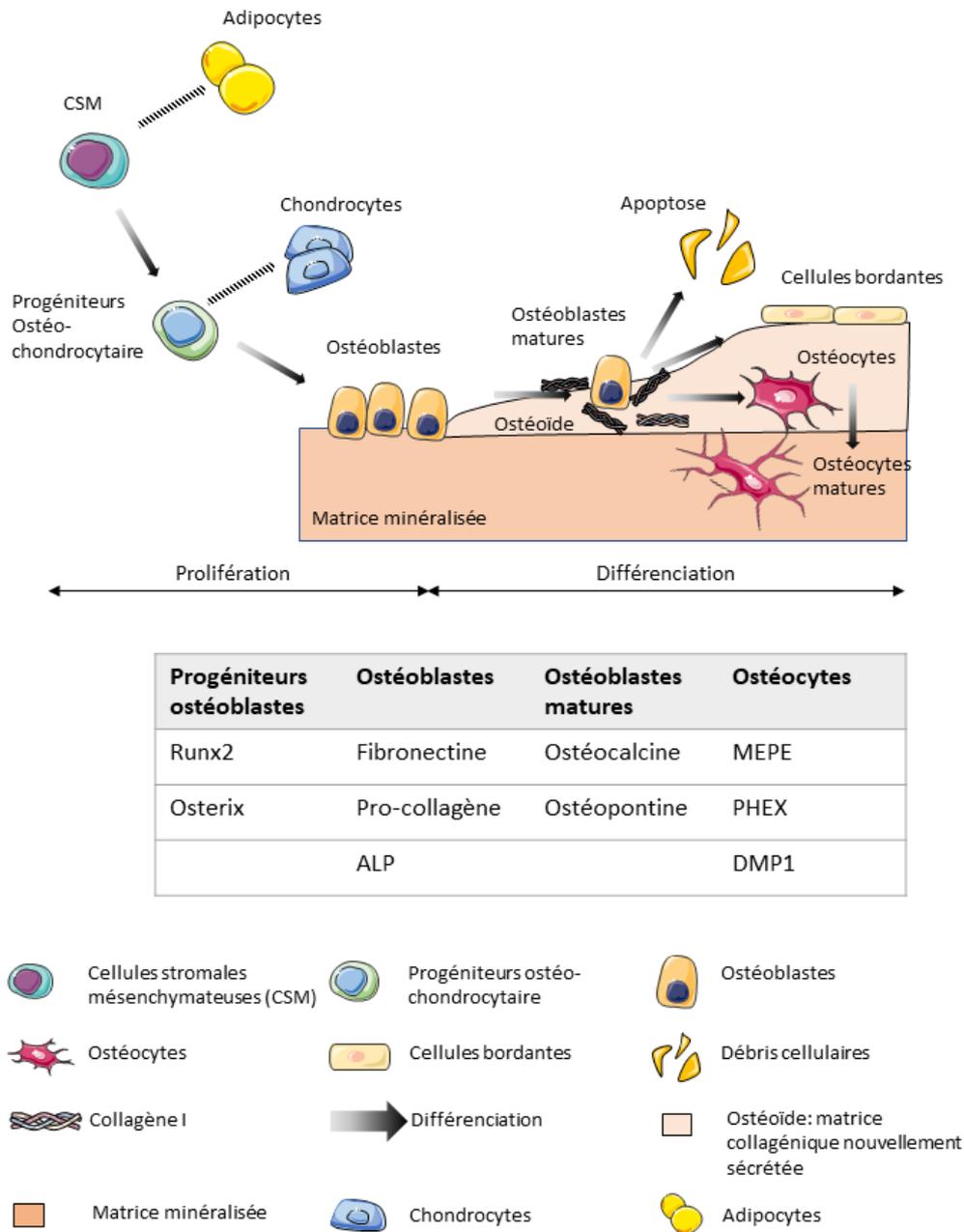


FIGURE 1.5 – Différenciation des cellules de la voie ostéoblastique et protéines exprimées à certains stades.

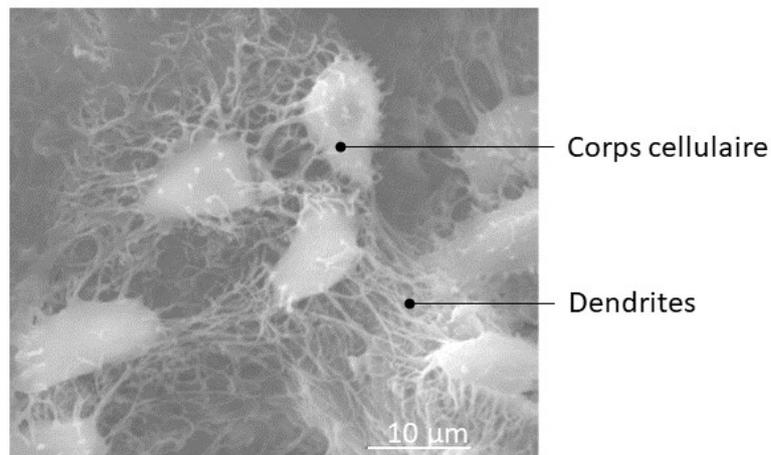


FIGURE 1.6 – Ostéocytes observés en microscopie électronique à balayage (d'après [25]).

dans des lacunes et les dendrites (prolongements cytoplasmiques) s'étendent dans toutes les directions, mais avec une préférence pour la direction parallèle à la surface osseuse [24] (figure 1.6).

Le mécanisme de transition des ostéoblastes en ostéocytes a longtemps été considéré comme un mécanisme passif au cours duquel les ostéoblastes se retrouveraient emmurés dans la matrice sécrétée [26]. De plus en plus de travaux indiquent au contraire qu'il s'agit en réalité d'un phénomène actif. Le premier changement consiste en la formation des dendrites, associée à une réduction du volume cytoplasmique [18]. Ce processus requière le clivage du collagène environnant par des métalloprotéinases matricielles (MMP) [27, 28]. Les différences entre les ostéoblastes et les ostéocytes s'observent au sein du cytosquelette des cellules [29] et par l'expression de protéines impliquées dans la contraction, notamment les chaînes lourdes et légères de myosine ou l' α -actine [30].

Le processus de différenciation des ostéoblastes en ostéocytes ne s'arrête pas lors de leur intégration dans la matrice. Il se poursuit jusqu'au stade d'ostéocytes matures. La durée de ce processus varie de 2 à 19 jours, suivant l'os, l'âge, le sexe et l'espèce animale [26]. Certaines protéines sont exprimées spécifiquement par les ostéocytes :

- E11 est exprimée uniquement dans les ostéocytes qui sont encore peu profonds dans la matrice [31],
- DMP1 et PHEX (phosphate regulating neutral endopeptidase on the chromosome X) participent à la régulation du métabolisme du phosphate et sont spécifiques aux ostéocytes ;
- MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) est très fortement exprimée par les ostéocytes et a un rôle d'inhibiteur de la formation osseuse [32],
- la sclérostine est exprimée uniquement par les ostéocytes matures et inhibe la formation osseuse [33].

Les ostéocytes forment un réseau de cellules interconnectées grâce à leur prolonge-

ments cytoplasmiques dans les canalicules. Ils possèdent des jonctions communicantes intercellulaires au bout de leurs dendrites [34]. Certaines dendrites sont connectées aux cellules bordantes et ostéoblastes en surface et d'autres sont connectées avec l'espace extra-osseux. Cela signifie que les ostéocytes peuvent communiquer avec la moelle osseuse sans l'intermédiaire des ostéoblastes ou des cellules bordantes [35]. Les ostéocytes sont capables d'étendre et rétracter leurs dendrites, leur permettant ainsi d'établir ou de rompre des connections avec les autres cellules.

Les ostéocytes synthétisent très peu de matrice extracellulaire. Cependant, ils contribuent à sa maturation et à sa minéralisation [24]. Ils sont aussi capables de dégrader la matrice autour de leurs corps cellulaires ou de leurs dendrites. Ce processus se produit notamment quand la demande en calcium augmente, par exemple pendant la lactation, ou bien dans le cas de certaines pathologies comme l'ostéoporose [36].

Les ostéocytes jouent un rôle central dans la régulation biomécanique de la masse et de l'architecture osseuses. L'application d'une contrainte sur l'os génère un flux du fluide contenu dans les canalicules autour des dendrites des ostéocytes. Les ostéocytes sont alors capables de détecter ce flux et de sécréter des molécules qui régulent l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes en réponse à la stimulation mécanique [37].

Les cellules bordantes sont l'autre voie de différenciation des ostéoblastes. Elles peuvent être réactivées en réponse à différents stimuli pour fournir un réservoir d'ostéoblastes. Ces cellules post-mitotiques peuvent se remettre à proliférer et contribuer à la formation osseuse [38].

b) Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption du tissu osseux. Ils dérivent des cellules souches hématopoïétiques circulant dans le sang. Ces cellules vont se différencier en précurseurs d'ostéoclastes puis fusionner entre elles après avoir atteint la surface osseuse pour former une cellule multinucléée de 100 μm de diamètre. La caractéristique principale des ostéoclastes est leur bordure en brosse sous lesquelles ils créent des lacunes de résorption (appelées lacunes de Howship) quand ils se fixent à la matrice osseuse [39]. La dégradation de la matrice de collagène est médiée par la cathépsine K spécifique des ostéoclastes, ainsi que par les métalloprotéinases (MMP) MMP-9 [40, 41].

La différenciation et l'activation des ostéoclastes sont contrôlées par les ostéoblastes et les ostéocytes. Les ostéocytes stimulent la formation d'ostéoclastes par la sécrétion de RANKL [42]. Cependant, un contact direct avec les ostéoblastes pourrait également contribuer à leur activation [43]. A l'inverse, l'ostéoprotégérine, un antagoniste de RANKL sécrété par les ostéoblastes, est responsable de l'activation des ostéoclastes [39].

1.1.1.3 L'os, un matériau vivant

Les cellules et la matrice sont en constante interaction, que ce soit lors du modelage ou par le remodelage qui a lieu tout au long de la vie. Le remodelage est un couplage entre résorption et formation osseuse qui sert à renouveler l'os en réponse à des stimuli mécaniques ou hormonaux. Ainsi, une stimulation mécanique, par exemple lors d'un exercice physique, va favoriser la formation osseuse par rapport à la résorption. À l'inverse, en l'absence de stimulation mécanique, la résorption va primer et provoquer une diminution de la masse osseuse [22]. Le couplage entre résorption et formation et la séquence du remodelage ont été identifiés par l'équipe de Frost [44]. Le taux de remodelage est d'environ 5 % par an dans l'os cortical et 20 % dans l'os trabéculaire adulte. Cette différence s'explique par un ratio surface/volume plus élevé dans l'os trabéculaire [22]. Le remodelage se produit via des unités multi-cellulaires (*Basic multicellular units*, BMU) composées d'ostéoclastes, d'ostéoblastes et d'un approvisionnement sanguin [45]. Dans l'os cortical, les BMU forment des canaux dirigés par les ostéoclastes qui progressent dans l'os en résorbant la matrice (figure 1.7). Ils sont suivis par les ostéoblastes qui sécrètent la nouvelle matrice. Dans l'os trabéculaire, les ostéoclastes créent des tranchées en surface. L'action des ostéoblastes et des ostéoclastes est couplée par un contrôle biochimique. Le taux de résorption est contrôlé par le ratio ostéoprotégérine/RANKL, deux protéines sécrétées par les cellules de la lignée ostéoblastique [46].

Le remodelage comprend quatre phases : l'activation et le recrutement des ostéoclastes, la résorption de la matrice, la sécrétion de la matrice (l'ostéoïde) et la minéralisation (figure 1.8) [46]. La phase de résorption par les ostéoclastes dure 6 à 12 jours et la sécrétion et minéralisation de la nouvelle matrice peuvent s'étendre sur plusieurs mois [47, 48]. Les ostéoblastes et ostéocytes sont responsables de la minéralisation en sécrétant des vésicules matricielles qui contiennent du phosphate de calcium (figure 1.9). La membrane des vésicules se dissout dans l'espace extra-cellulaire et libère le minéral qui se fixe au collagène. Le minéral subit ensuite un réarrangement en cristaux d'hydroxyapatite le long des fibrilles de collagène. Le minéral est présent à l'extérieur et à l'intérieur des fibres de collagène [49, 50].

Contrairement au remodelage, dans le cas du modelage, la formation et la résorption se produisent sur des surfaces séparées. Les deux événements sont donc découplés. En conséquence, le modelage modifie la forme du squelette osseux [22]. Le modelage se produit principalement pendant la croissance mais peut aussi se produire chez les adultes en réponse à un changement de chargement mécanique [22, 46].

Dans le contexte de la croissance, la formation osseuse a lieu via deux mécanismes : la formation intramembraneuse ou la formation endochondrale. Dans le cas de la formation intra-membraneuse, les cellules souches de la moelle osseuse forment un agrégat, puis se différencient en ostéoblastes avant de sécréter la matrice osseuse. Ce processus est notamment impliqué dans la formation des os du crâne et du visage. La formation

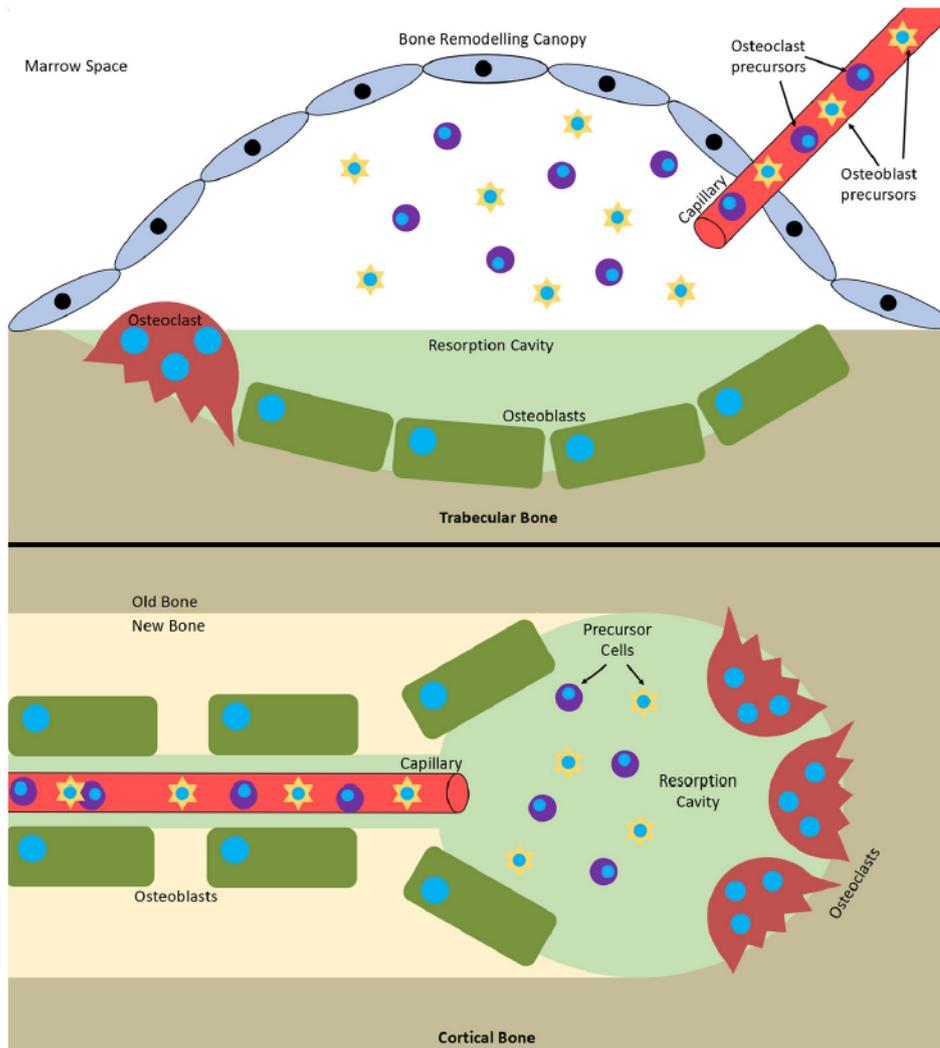


FIGURE 1.7 – Unités de remodelage multi-cellulaire (BMU) lors du remodelage dans l'os trabéculaire et dans l'os cortical [46].

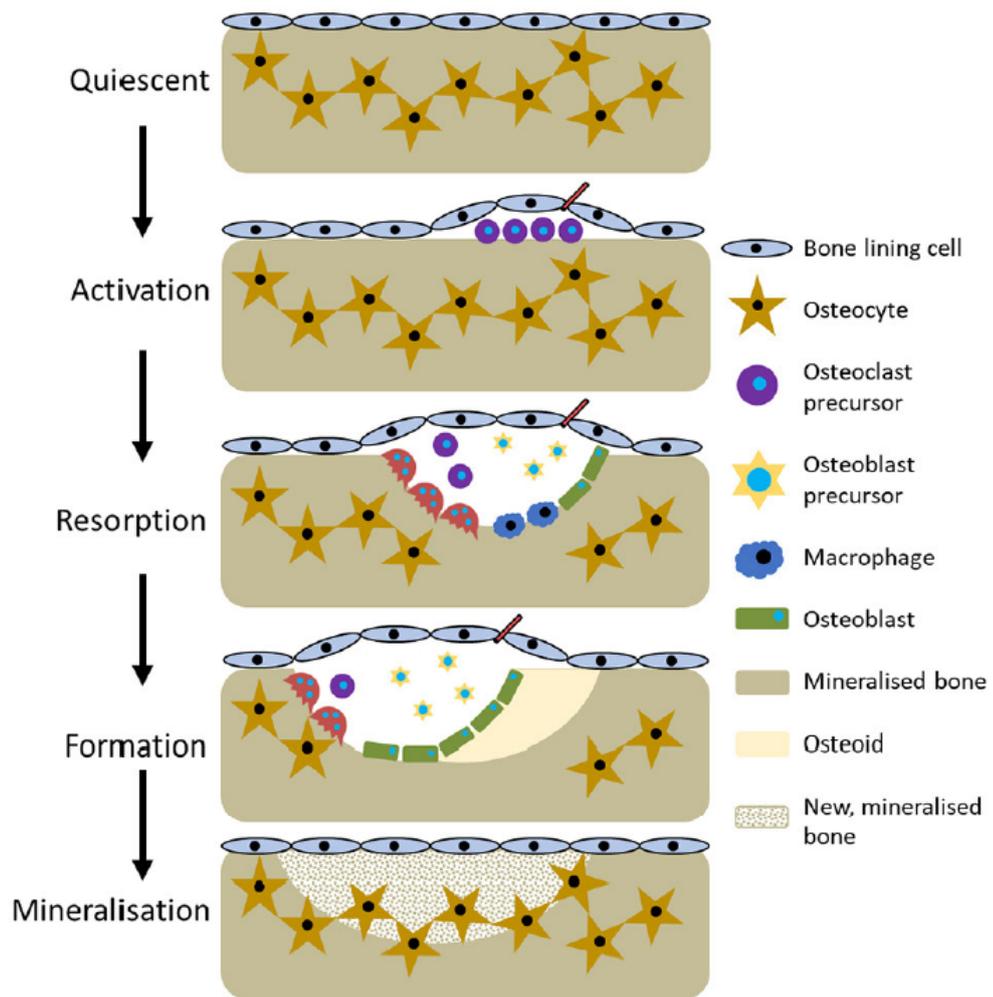


FIGURE 1.8 – Les étapes du remodelage [46].

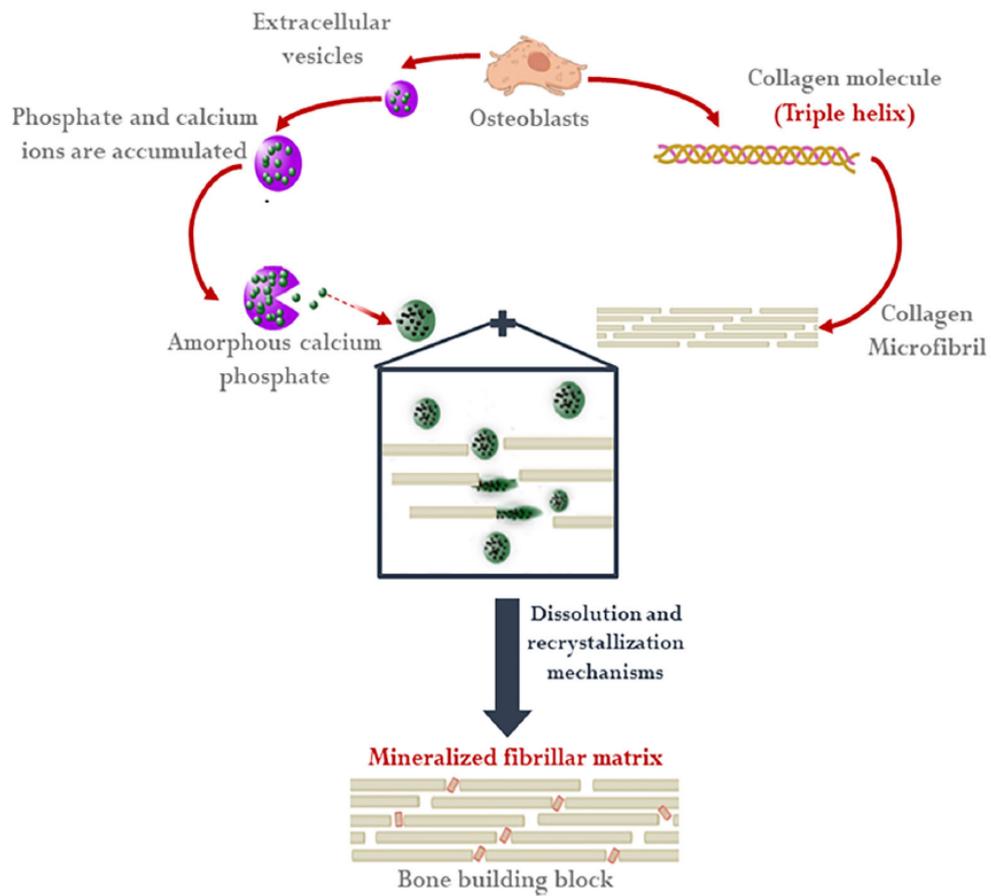


FIGURE 1.9 – Minéralisation des fibres de collagène [49].

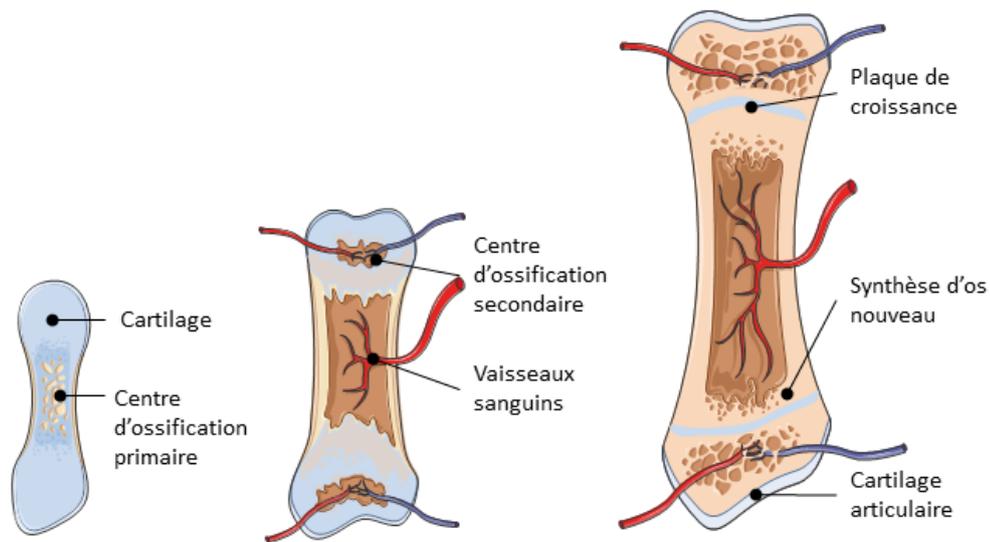


FIGURE 1.10 – La croissance des os longs par ossification endochondrale.

endochondrale implique la synthèse temporaire d'une matrice de cartilage progressivement remplacée par la matrice osseuse. C'est ce qui se produit lors de la croissance des os longs : les plaques de croissance sont des zones cartilagineuses jusqu'à l'arrêt de la croissance et l'ossification complète de ces plaques [51] (figure 1.10).

Enfin, la formation d'os nouveau peut avoir lieu à la suite d'une fracture. Si le défaut est inférieur à 2,5 fois le diamètre de l'os, il peut se réparer sans intervention extérieure [52]. Le mécanisme de réparation est identique à celui l'ossification endochondrale avec la synthèse d'une matrice provisoire de cartilage (figure 1.11). Dans un premier temps, la fracture crée un hématome puis un caillot de fibrine qui sert de support pour la prolifération des cellules impliquées dans la réparation osseuse. Une phase inflammatoire servant à nettoyer la plaie a également lieu. La réparation de la fracture commence en périphérie. Un cal temporaire de cartilage est formé puis est progressivement remplacé par de l'os. Dans le même temps, la vascularisation progresse. L'os tissé formé rapidement est ensuite progressivement remodelé en os lamellaire [51].

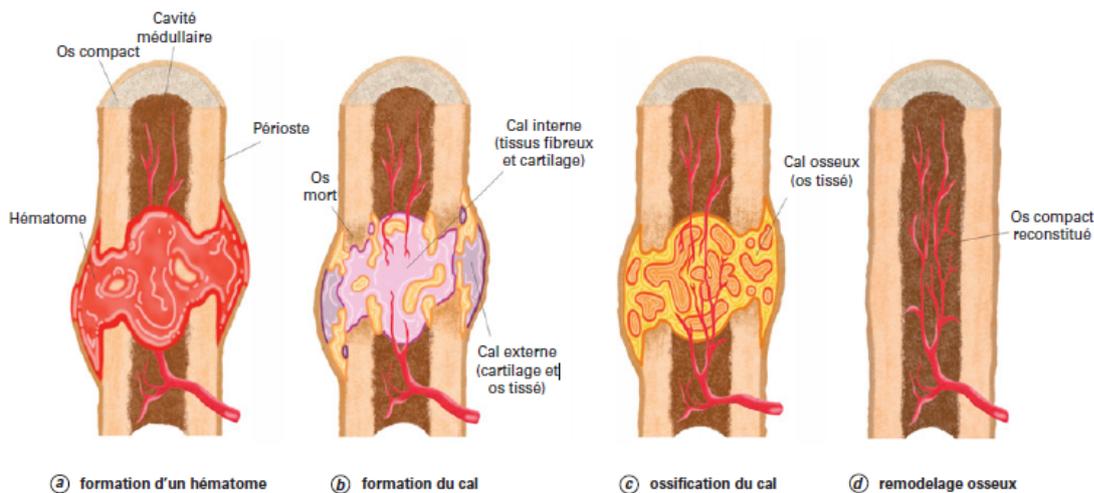


FIGURE 1.11 – Réparation de fracture [53].

1.1.2 Les propriétés mécaniques du tissu osseux

Les propriétés mécaniques de l'os dépendent du site anatomique, de l'âge du donneur, du tissu (trabéculaire ou cortical), de l'orientation (longitudinale ou transversale car l'os est anisotrope) et de l'essai réalisé (tableau 1.1). A l'échelle de la matrice, la minéralisation augmente la rigidité comparée à la matrice organique nouvellement déposée (ostéoïde). Ainsi, l'indentation de l'os mature donne un module d'élasticité d'environ 20 GPa [12] alors que la mesure par microscopie à force atomique (AFM) du module d'élasticité de l'ostéoïde donne 27 kPa [54].

Méthode	Tissu	Module d'élasticité	Référence
Compression longitudinale	Trabéculaire	18 MPa	[12]
Compression transversale	Trabéculaire	6 – 10 MPa	[12]
Compression longitudinale	Cortical	17,4 GPa	[55]
Compression transversale	Cortical	9,6 GPa	[55]
Nanoindentation	Cortical	20 GPa	[12]
AFM	Cortical (boeuf)	8 GPa	[56]
AFM	Ostéoïde	27 kPa	[54]

TABLE 1.1 – Module d'élasticité de l'os cortical et trabéculaire obtenu par différentes méthodes. AFM : microscopie à force atomique.

1.1.3 Les modèles d'os *in vitro*

Les modèles *in vivo* sont utiles pour comprendre les mécanismes de réparation de fracture [57] ou pour prendre en compte des effets systémiques sur l'os. A l'inverse, ils ne sont pas adaptés à l'isolation d'un effet spécifique sur le comportement des cellules car l'environnement est complexe et de multiples facteurs agissent en même temps. Les modèles *in vitro* sont donc utiles pour étudier des phénomènes spécifiques de manière isolée. Pour réaliser un modèle *in vitro*, il est nécessaire d'identifier une source de cellules, un matériau biocompatible et une méthode de bio-fabrication adaptée.

1.1.3.1 Les différentes sources de cellules

a) Les ostéoblastes

Il existe deux catégories de cellules disponibles pour les ostéoblastes : les cellules primaires, extraites des tissus osseux, et les cellules de lignée immortalisée.

La première extraction d'ostéoblastes primaires à partir de tissus osseux a été réalisée par Peck *et al* en 1964 [58] à partir de calvaria (os du crâne) de rats. Les cellules ont été extraites après digestion des tissus par de la collagénase. Depuis, la méthode a été appliquée avec succès à des tissus humains. Il est également possible d'isoler des ostéoblastes à partir de culture d'explants osseux (figure 1.12) [59-61]. Les cellules isolées après digestion enzymatique prolifèrent plus vite mais démontrent des résultats contradictoires sur l'activité de l'ALP. De plus, la minéralisation de la matrice extracellulaire après 27 jours de culture est plus importante pour les cellules extraites avec le protocole de culture d'explants que pour celles extraites par digestion enzymatique [62-64].

Comme l'expression de gènes et protéines des ostéoblastes humains primaires varient en fonction de l'âge du donneur, du site de prélèvement et du type de tissu (trabéculaire ou cortical) [62], les cellules primaires animales sont parfois utilisées en alternative aux cellules humaines. Il est en effet plus facile de contrôler l'âge, le sexe et le poids de l'animal, ainsi que le type d'os (par exemple calvaria ou fémur). De plus, les tissus osseux humains utilisés pour les extractions de cellules sont généralement des déchets opératoires produits lors de pose de prothèses. Ils proviennent donc de patients généralement âgés avec un métabolisme osseux altéré. L'utilisation d'animaux permet d'obtenir des tissus de spécimens jeunes et sains. Cependant, des différences inter espèces dans les comportements cellulaires ont été observées, notamment lors de la composition et du remodelage de la matrice osseuse, ainsi que dans les voies de signalisation ou dans les processus de réparation de fracture. Il n'est donc pas toujours possible d'extrapoler un résultat obtenu avec des cellules animales aux humains [46, 62, 66].

Une alternative à l'extraction d'ostéoblastes est l'utilisation de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) extraites de la moelle osseuse [67]. Ces cellules peuvent être ensuite différenciées en ostéoblastes *in vitro*. Il est également possible de travailler à partir

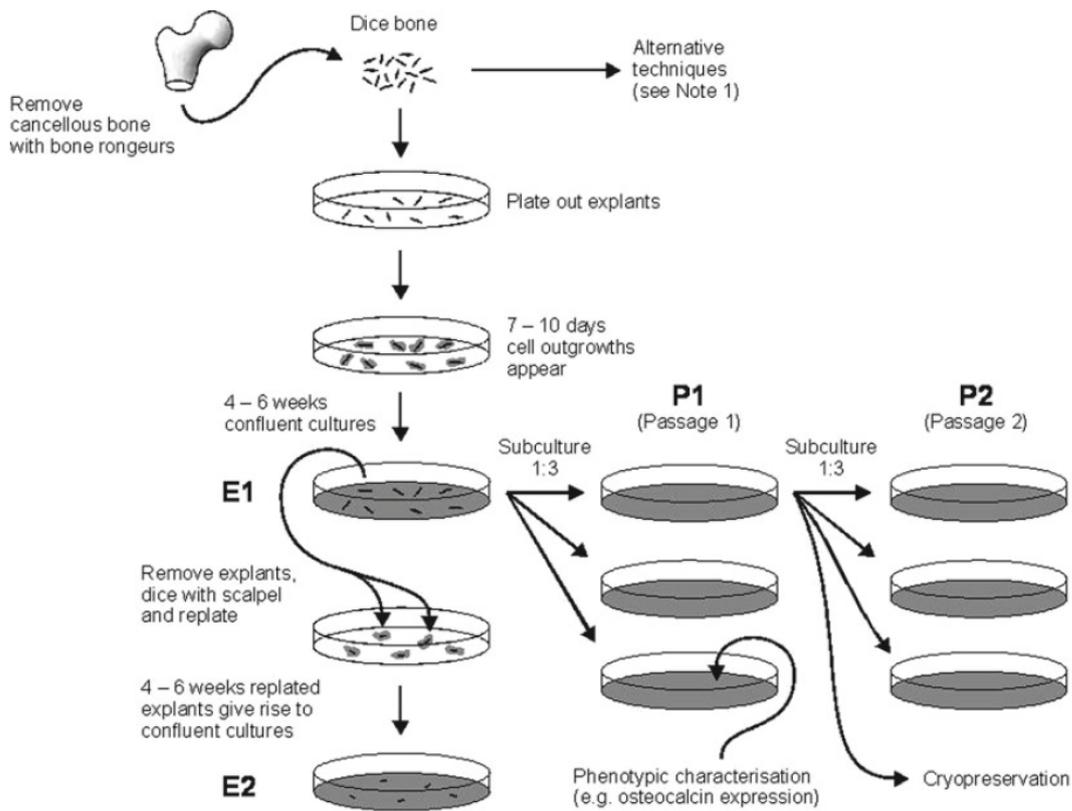


FIGURE 1.12 – Procédure d’isolation d’ostéoblastes primaires à partir d’os trabéculaire [65].

de cellules souches extraites de tissus adipeux ou du cordon ombilical [68].

Les avantages de l'utilisation de cellules primaires résident dans l'applicabilité clinique des résultats obtenus et l'absence de différences inter espèces. Cependant, ces avantages sont accompagnés de différents inconvénients tels que l'hétérogénéité phénotypique des populations, des procédures d'isolation longues avec un accès restreint aux donneurs et une forte variabilité inter donneurs. Un autre inconvénient majeur reste la sénescence des cellules primaires et leur nombre de doublements de population limité [62, 69].

Pour contourner les inconvénients, certaines études utilisent des lignées de cellules immortalisées (tableau 1.2). Ces cellules sont généralement faciles à maintenir en culture, permettent d'obtenir un nombre de cellules quasiment illimité et offrent une meilleure répétabilité avec des populations généralement plus homogènes. Cependant, ces cellules démontrent aussi certaines dérives phénotypiques après un grand nombre de passages. Par ailleurs, elles ne représentent pas toute la gamme de caractéristiques phénotypiques des cellules primaires. En effet, ces lignées cellulaires sont arrêtées à un certain stade de développement. De plus, l'interaction de ces cellules avec leur environnement est parfois perturbée. Elles peuvent perdre l'inhibition de contact, ce qui leur confère un comportement de cellules cancéreuses, ou subir des modifications des mécanismes d'adhésion cellulaires [9, 62, 70].

b) Les ostéocytes

L'utilisation d'ostéocytes primaires est moins fréquente que celle des ostéoblastes primaires. Ces cellules sont plus difficiles à extraire du fait de leur localisation profonde dans la matrice minéralisée. De plus, les ostéocytes étant une population cellulaire non proliférative, il n'est pas possible de les amplifier *in vitro* préalablement à la production des modèles [24, 78].

La première extraction d'ostéocytes comportait une étape de purification des cellules via un anticorps qui ciblait spécifiquement les ostéocytes mais qui était disponible uniquement pour les ostéocytes de poulet [79, 80]. Par la suite, les protocoles ont été modifiés pour permettre l'obtention de populations d'ostéocytes purifiées sans avoir recours à cet anticorps. Ceci a permis l'extraction d'ostéocytes d'autres espèces. Les protocoles élaborés reposent sur des digestions séquentielles de fragments osseux à la collagénase ainsi que sur une étape de décalcification à l'EDTA pour favoriser l'extraction des ostéocytes [81]. Les cellules obtenues lors des deux premières digestions à la collagénase sont généralement négatives à la phosphatase alcaline. Les quatre digestions suivantes libèrent des ostéoblastes et c'est seulement ensuite que les étapes de digestion permettent de collecter des ostéocytes. Cependant, même les cellules libérées dans les dernières digestions ne contiennent que 20 % d'ostéocytes [78]. Ce rendement a été amélioré en broyant les fragments osseux avant les digestions à la collagénase et en ajoutant d'autres étapes de décalcification à l'EDTA [82, 83]. L'inconvénient majeur de cette méthodologie est que les digestions séquentielles à la collagénase impactent le profil d'expression génétique des cellules [84] extraites. Le

Lignée	Origine	Méthode d'immortalisation	Phénotype	Référence	Nombre d'études avec cette lignée (scopus)
MC3T3	Calvaria de souris	Immortalisation spontanée	Pré-ostéoblaste	[71]	8000
MG63	Ostéosarcome humain (garçon de 14 ans)	Spontanée (cancer)	Pré-ostéoblaste	[72, 73]	6000
SaOs-2	Ostéosarcome humain (fille de 11 ans)	Spontanée (cancer)	Ostéoblaste mature	[74]	3000
hFOB 1.19	Fœtus humain (os longs)	SV40 TAG sensible à la température	Pré-ostéoblaste	[75]	226
UMR-106	Ostéosarcome de rat	Spontanée (cancer)	Ostéoblaste mature	[76]	802
ROS 17/2	Ostéosarcome de rat	Spontanée (cancer)	Pré-ostéoblaste	[77]	760

TABLE 1.2 – Principales lignées d'ostéoblastes disponibles commercialement.

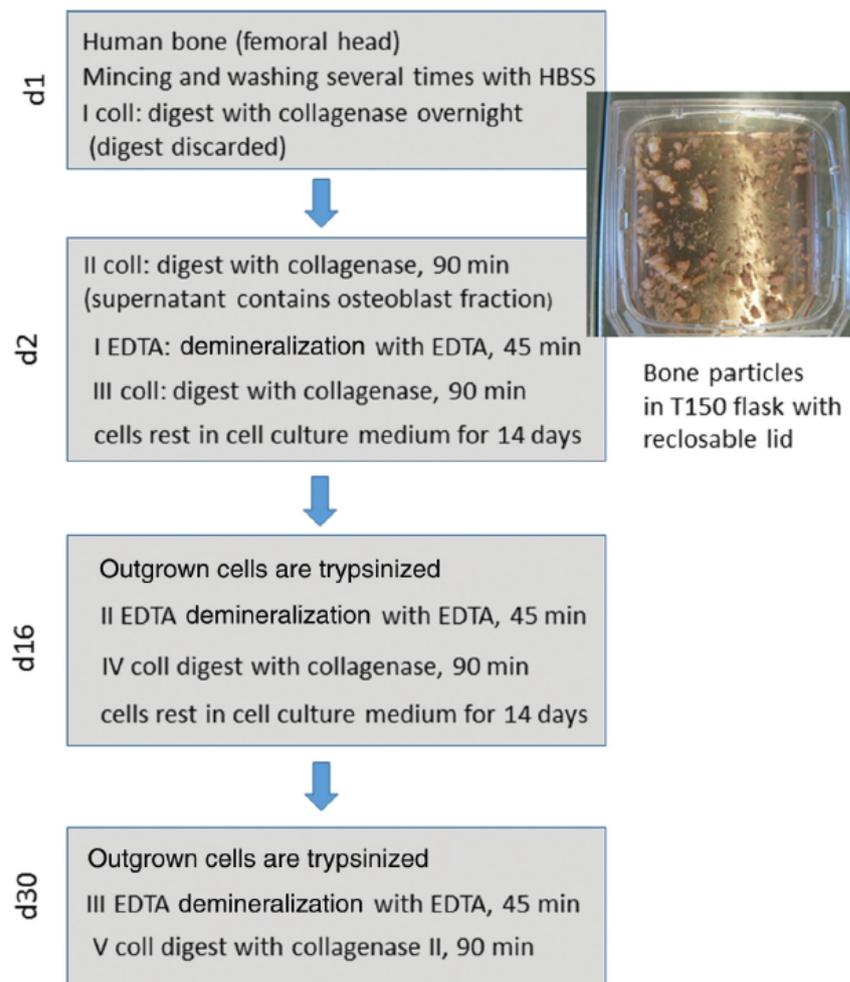


FIGURE 1.13 – Protocole d’isolation d’ostéocytes humains proposé par Bernhardt *et al* (2020) [86]

protocole a également été adapté pour l’extraction d’ostéocytes humains [85]. L’ajout d’un temps de repos entre la digestion à la collagénase et la décalcification à l’EDTA permet d’augmenter la portion d’ostéocytes dans la population de cellules extraites (figure 1.13) [86].

Comme les ostéocytes sont confinés dans leurs lacunes et connectés les uns aux autres uniquement par leurs dendrites *in vivo*, il est nécessaire de les cultiver *in vitro* dans des environnements 3D pour reproduire ce cloisonnement. Lorsqu’ils sont cultivés sur des substrats en 2D, certaines fonctions et caractéristiques morphologiques, telles que les dendrites, sont affectées [78].

Il est également possible d’obtenir des ostéocytes humains à partir d’ostéoblastes primaires humains différenciés *in vitro* dans des gels de collagène pendant 4 à 6 semaines [87, 88].

Pour contourner les difficultés liées à l’obtention d’ostéocytes primaires, des lignées d’ostéocytes immortalisés ont été développées. Le tableau 1.3 présente les différentes

lignées existantes. Une seule lignée a été établie à partir d'ostéocytes humains, les autres lignées sont d'origine murine. La lignée MLO-Y4 a été la première établie et caractérisée et reste la plus utilisée. Comme pour les lignées d'ostéoblastes, les lignées d'ostéocytes ont des comportements différents des cellules primaires. La différence principale est le maintien de leur capacité proliférative, alors que l'une des caractéristiques phénotypique des ostéocytes primaires est d'être post-mitotiques et non prolifératives. De plus, les lignées d'ostéocytes sont établies à partir de populations clonales, donc elles ne représentent pas la diversité de phénotypes des ostéocytes primaires. **Que ce soit pour les ostéoblastes ou les ostéocytes, l'utilisation de cellules primaires humaines restent la meilleure option pour transférer les résultats de la recherche fondamentale en applications thérapeutiques.**

1.1.3.2 Les modèles *in vitro* existants

L'ingénierie tissulaire osseuse a deux objectifs principaux : combler les défauts osseux trop importants pour se régénérer seuls ou produire des modèles *in vitro* pour la compréhension des mécanismes biologiques en alternative aux modèles animaux [95]. Dans tous les cas, les modèles *in vitro* doivent fournir un environnement en trois dimensions aux cellules osseuses afin de reproduire les interactions cellules-matrice [49]. Il a notamment été montré que les ostéocytes cultivés sur des supports en deux dimensions perdaient leur phénotype [26] et étaient exposés à des niveaux d'oxygène plus élevés qu'*in vivo* [96], ce qui affecte l'expression de leurs gènes [97]. Il est donc nécessaire de développer un modèle intermédiaire entre les modèles 2D qui procurent un environnement cellulaire contrôlé mais éloignés de l'environnement *in vivo* et les modèles animaux complexes mais qui ne permettent pas de contrôler précisément l'environnement et qui ne sont pas représentatifs des tissus humains [98].

Les matériaux utilisés pour l'ingénierie tissulaire osseuse dans le cas de modèles 3D *in vitro* doivent satisfaire certains critères :

- être biocompatibles et biodégradables afin que les cellules puissent remplacer le matériau par leur matrice extracellulaire,
- favoriser les interactions cellules-matrice,
- permettre une organisation des fibres de collagène aux échelle nanoscopique et microscopique afin de reproduire une organisation de la matrice similaire à celle *in vivo*.

Deux approches co-existent : l'ensemencement de cellules sur un scaffold (matériau support) ou bien l'ensemencement des cellules dans un hydrogel moulé ou bio-imprimé. Les hydrogels sont définis comme des matériaux constitués de polymères possédant une capacité élevée de rétention des fluides [49]. Dans le cadre de nos travaux, c'est cette approche qui nous intéresse et que nous allons développer dans la suite. En effet, les scaffolds offrent une structure en trois dimensions, mais les cellules ne sont pas entourées de matrice comme c'est le cas *in vivo*. En revanche, les hydrogels permettent d'introduire

Lignée	Origine	Méthode d'immortalisation	Phénotype	Référence	Nombre d'études avec cette lignée (scopus)
MLO-Y4	Os long de souris de transgénique ostéocalcine-SV40TAG	SV40 TAG	Ostéocytes	[89]	357
MLO-A5	Os long de souris de transgénique ostéocalcine-SV40TAG	SV40 TAG	Ostéoblastes tardifs/pré-ostéocytes	[90]	57
IDG-SW3	Souris transgénique Dmp1-GFP croisée avec souris IFN γ – SV40 TAG	SV40 TAG température dépendant	Ostéoblastes tardifs/pré-ostéocytes	[91]	38
Ocy454	Souris transgénique Dmp1-GFP croisée avec souris IFN γ – SV40 TAG	SV40 TAG température dépendant	Ostéocyte mature	[92]	18
OmgFPp66	Souris transgénique Dmp1-GFP	SV40 TAG température dépendant	Ostéoblaste à Ostéocyte mature	[93]	2
HOB-01-C1	Col fémoral d'une femme de 82 ans	SV40 TAG température dépendant	Pré-ostéocytes	[94]	2

TABLE 1.3 – Lignées d'ostéocytes existantes.

les cellules au sein d'une matrice artificielle avec laquelle elles vont interagir, ce qui est plus proche des conditions *in vivo*.

Les deux principales méthodes de mise en forme des hydrogels sont le moulage et la bio-impression (figure 1.14). Ces deux méthodes requièrent la préparation d'une suspension de cellules dans des polymères. Dans le cas du moulage, cette solution est versée sous forme liquide dans un moule. La géométrie est généralement stabilisée par réticulation des polymères composant l'hydrogel. La bio-impression nécessite une étape préliminaire de définition et de tranchage de la géométrie du construit à imprimer. Il faut ensuite régler les paramètres d'impression, tels que l'épaisseur des couches déposées et la vitesse d'impression. Les deux techniques de dépôt de la bio-encre les plus utilisées sont l'extrusion et le jet d'encre. L'extrusion dépose un filament continu tandis que le jet d'encre éjecte des gouttelettes d'encre. La bio-encre doit posséder des propriétés rhéologiques particulières pour minimiser les contraintes de cisaillement lors du passage des cellules dans la buse tout en assurant l'imprimabilité et le maintien de la géométrie choisie [99]. Une viscosité faible et un comportement rhéofluidifiant permettent de minimiser les forces de cisaillement, et donc d'éviter la mort des cellules [99]. La contrainte seuil de la bio-encre détermine la force à appliquer pour initier l'écoulement, et est liée à la hauteur maximale de l'objet imprimé avant qu'il ne s'effondre [100]. Ainsi, les hydrogels utilisés pour la bio-impression doivent répondre à un cahier des charges plus exigeants que les hydrogels simplement moulés. Cependant, la bio-impression offre des avantages majeurs tels qu'un contrôle précis de la géométrie et de la porosité du construit imprimé, ainsi qu'une bonne reproductibilité du fait de l'automatisation du procédé de déposition de la bio-encre [101].

L'utilisation d'hydrogels a permis de mettre en avant la réponse de plusieurs types de cellules à différents modules d'élasticité [102]. Cependant, la matrice extracellulaire a un comportement viscoélastique qui n'est pas entièrement caractérisé par le module d'élasticité. En effet, les matériaux viscoélastiques combinent un comportement de liquide visqueux et de solide élastique. Ils ont deux principales caractéristiques. La première est leur capacité à dissiper une partie de l'énergie, à l'inverse des matériaux purement élastique qui stocke l'énergie avant de la restituer. La deuxième est leur réponse dépendante du temps à une contrainte mécanique [102]. Les propriétés mécaniques des hydrogels peuvent être évaluées de différentes manières. Les méthodes les plus couramment utilisées sont l'analyse mécanique dynamique (DMA) et la compression non confinée. La DMA applique des contraintes sinusoïdales de compression ou de cisaillement à différentes fréquences [102]. L'avantage de cette méthode est de fournir des informations sur les comportements visqueux et élastique des hydrogels. A l'inverse, la compression non confinée, réalisée à l'échelle macroscopique, procure uniquement des informations sur le comportement élastique des hydrogels. La caractérisation du comportement viscoélastique des hydrogels est essentielle pour comprendre le comportement des cellules. Il a notamment été montré que la viscoélasticité des hydrogels influençait la différenciation de cellules stromales mésenchymateuses en ostéoblastes [102].

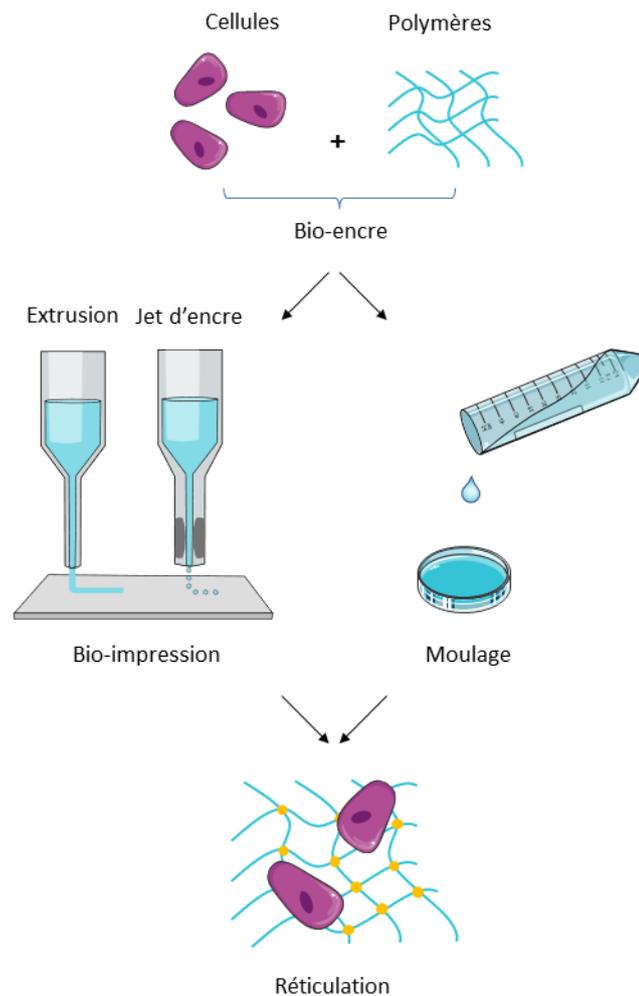


FIGURE 1.14 – Bio-fabrication d’hydrogel. Les cellules et les polymères sont mélangés pour former une solution. Cette solution peut être soit bio-imprimée par extrusion ou par jet d’encre, soit moulée. La réticulation sert ensuite à consolider l’hydrogel en créant des liaisons entre les molécules de polymère.

Les hydrogels de collagène moulés ont été largement utilisés pour la production de modèles *in vitro* de tissus osseux. En effet, ils permettent de reproduire la transition des ostéoblastes en ostéocytes [87, 88, 103-107]. Cependant, l'utilisation d'hydrogels de collagène possède de nombreux inconvénients tels que leurs propriétés mécaniques difficilement contrôlables et leur taux de dégradation très rapide. De plus, le collagène n'est pas imprimable seul à moins de l'utiliser à une concentration supérieure à 20 mg/mL, ce qui est 3 à 13 fois plus élevée que les concentrations utilisées habituellement [49]. Pour compenser ces inconvénients, le collagène peut être combiné à d'autres polymères [68, 105, 108] ou à des renforts minéraux pour reproduire la matrice osseuse minéralisée [87, 109]. D'autres polymères sont également couramment utilisés, qu'ils soient naturels comme l'alginate, la gélatine ou l'agarose [108, 110-117] ou synthétiques [118-120]. La gélatine représente une alternative particulièrement intéressante au collagène car elle conserve sa capacité à former une structure en triple hélice à des températures inférieures à 30 °C [49] et fournit des peptides RGD nécessaires à l'adhésion cellulaire [121].

L'un des avantages de la bio-impression par rapport au moulage des hydrogels est la possibilité de moduler la forme et la porosité. Cela peut être notamment utile pour reproduire la porosité de l'os trabéculaire, ou bien créer un matériau poreux qui permette la circulation d'un flux. Les études qui ont utilisé cette technique ont souvent travaillé avec des lignées de cellules murines (MC3T3, MLO-Y4, IDG-SW3) [119, 122] ou des cellules souches animales [110]. Les études concernant des cellules humaines ont souvent été réalisées sur des temps courts qui ne permettent pas d'atteindre la différenciation complète des ostéoblastes en ostéocytes ou d'avoir une synthèse de matrice conséquente [111, 112, 116]. Or, ce sont les ostéocytes qui régulent la structure globale de l'os et influencent l'organisation de la matrice. Ils devraient donc être inclus dans les modèles *in vitro* [95]. Les études qui ont gardé en culture des cellules primaires humaines bio-imprimées plus de 20 jours sont récapitulées dans le tableau 1.4. Une seule étude a utilisé des ostéoblastes. Dans ce cas, la transition d'ostéoblastes en ostéocytes était incomplète après 28 jours de maturation. Aucune étude avec des cellules primaires humaines bio-imprimées n'a montré l'expression de marqueurs protéiques des ostéocytes.

A l'inverse, plusieurs études ont utilisé les hydrogels de collagène moulés pour reproduire la transition des ostéoblastes en ostéocytes (tableau 1.5). Le module d'élasticité de l'hydrogel est rapporté dans une seule étude [106] et il est un ordre de grandeur plus faible que celui qui a été rapporté pour l'ostéoïde [54].

Il y a donc d'un côté des études avec des cellules primaires qui s'intéressent à la transition ostéoblastes-ostéocytes dans des hydrogels de collagène moulés, et de l'autre des études avec des cellules bio-imprimées qui, soit n'utilisent pas de cellules primaires humaines, soit ne permettent pas d'atteindre la différenciation complète des ostéoblastes en ostéocytes. A ce jour, il n'existe donc pas de modèles *in vitro* produit par bio-impression de cellules primaires qui montrent une différenciation complète des ostéoblastes en ostéocytes.

Matériaux	Modules	Cellules	Densité cellulaire	Durée des cultures	Différenciation en ostéocytes	Référence
PEGDMA et renfort minéral	$E = 300\text{kPa}$	C5M	6.10^6 cell/mL	21 jours	Non évaluée	[118]
Collagène et renfort minéral	$E = 19\text{kPa}$	ASC + HU-VECs	Non renseigné	28 jour	Non évaluée	[123]
Agarose et collagène en proportions variables	$E = 18,1$ à 89 kPa	C5M	$1,6.10^6$ cell/mL	21 jours	Uniquement évaluée par la morphologie : extension de dendrites dans les construits les plus mous	[124]
Gélatine et acide hyaluronique méthacrylés et renfort minéral	$G' = 29.6\text{kPa}$ sans minéral et 35.1kPa avec minéral	ASC	5.10^6 cell/mL	28 jours	Non évaluée	[113]
Gélatine méthacrylée et PEGDA	Non renseigné	Ostéoblastes de mâchoire	20.10^6 cell/mL	28 jours	Expression du gène Dmp1 à J28 marque le début de la transition ostéoblastes - ostéocytes	[125]
Alginate, gélatine et glycérol	$E = 0,66\text{kPa}$ (0,8% d'alginate) ou $5,4\text{ kPa}$ (1,8% d'alginate)	C5M	5.10^6 cell/mL	42 jours	Transition ostéoblastes - ostéocytes initiée à J42	[117]

TABLE 1.4 – Modèles de tissus osseux bio-imprimés avec des cellules humaines et conservés au moins 20 jours en culture. C5M : cellules stromales mésenchymateuses (de moelle osseuse). ASC : cellules stromales de tissus adipeux. HUVEC : cellules endothéliales vasculaires.

Cellules	Densité d'ensemencement	Module d'élasticité du gel	Durée des cultures	Principaux résultats	Référence
CSM	$5 \cdot 10^5$ cell/mL	Non renseigné	21 jours	Phénotype ostéocytes validé par l'expression protéines des DMP-1 et E11	[109]
Ostéoblastes	0, $25 \cdot 10^6$ ou $1 \cdot 10^6$ cell/mL	0,72 kPa	21 jours	Transition ostéoblastes - ostéocytes uniquement à $1 \cdot 10^6$	[106]
Ostéoblastes	$1 \cdot 10^5$ cell/mL	Non renseigné	28 jours	Différenciation partielle en ostéocytes	[126]
Ostéoblastes	Non renseigné	Non renseigné	21 jours	Phénotype ostéocyte validé par la morphologie et l'expression de gènes (E11, DMP-1, SOST)	[88]
Ostéocytes	$1 \cdot 10^5$ cell/mL	Non renseigné	14 jours	Maintien de la morphologie des ostéocytes	[87]

TABLE 1.5 – Modèles *in vitro* de tissus osseux obtenus avec des ostéoblastes ou ostéocytes primaires humains dans des gels de collagène. CSM : cellules stromales mésenchymateuses.

1.2 La peau

1.2.1 Composition et organisation de la peau

La peau est l'organe le plus large du corps humain : sa surface couvre en moyenne 1,7 m² et elle représente 10 % du poids d'un individu. Elle joue un rôle de thermorégulation et de barrière physique et immunologique [127]. Elle comporte également des mécanorécepteurs et intervient dans le sens du toucher [128]. C'est dans la peau que se trouvent les glandes sudoripares et sébacées, qui sécrètent la sueur et le sébum, ainsi que les follicules pileux [127]. La peau est un organe innervé et vascularisé [128] découpé en trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 1.15).

L'épiderme est un tissu avasculaire composé principalement de cellules et qui s'auto-renouvelle en continu. Il est composé de quatre couches : le *stratum basal*, le *stratum spinosum*, le *stratum granulosum* et le *stratum corneum* en surface (figure 1.15). Les kératinocytes sont les principales cellules de l'épiderme. Ils prolifèrent dans le *stratum basal*, puis migrent vers le *stratum corneum* tout en se différenciant où ils atteignent le stade de cornéocytes au bout de 28 jours [128]. Les autres cellules sont les mélanocytes qui sont responsables de la pigmentation de la peau, les cellules de Merkel responsables de la perception tactile et les cellules de Langerhans qui font partie du système immunitaire [129].

Le derme est séparé de l'épiderme par une lame basale composée de glycoprotéines et de protéoglycanes [130]. Son épaisseur varie de 0,6 mm sur les paupières à 3 mm au niveau de la paume des mains et de la plante de pieds [131]. Le derme est composé du derme papillaire situé immédiatement sous l'épiderme et du derme réticulaire qui s'étend jusqu'à l'hypoderme (figure 1.15). Les deux compartiments sont séparés par le plexus vasculaire [131]. Les cellules présentes dans le derme sont les fibroblastes et les cellules du système immunitaire. Les fibroblastes du derme réticulaire et du derme papillaire ont des profils génétiques différents [128]. Ceux du derme papillaire ont une activité de synthèse de matrice plus élevée que dans le derme réticulaire. Ils sont aussi plus nombreux [131].

Les fibroblastes dermiques sont responsables de la synthèse et de la dégradation des protéoglycanes et des protéines de la matrice extracellulaire [132]. On parle ici aussi de remodelage de la matrice extracellulaire. Ainsi, ils sécrètent des protéases matricielles afin de dégrader et réorganiser la matrice extracellulaire [131]. En termes de répartition, la matrice extracellulaire du derme est composée à 72 % de collagène (dont 80 % de collagène I et 20 % de collagène III), 4 % de fibres élastiques et 0,2 % de protéines d'adhérence telle que la fibronectine, au sein de la substance fondamentale composée de glycosaminoglycanes (GAG) et protéoglycanes [4]. Dans le derme papillaire, les fibres de collagène sont orientées parallèlement ou obliquement à la surface de la peau. Dans le derme réticulaire, les fibres de collagène et les fibres élastiques s'entrecroisent, formant une structure "tissée" [131, 132]. Les fibres élastiques sont composées des fibres oxytalanes

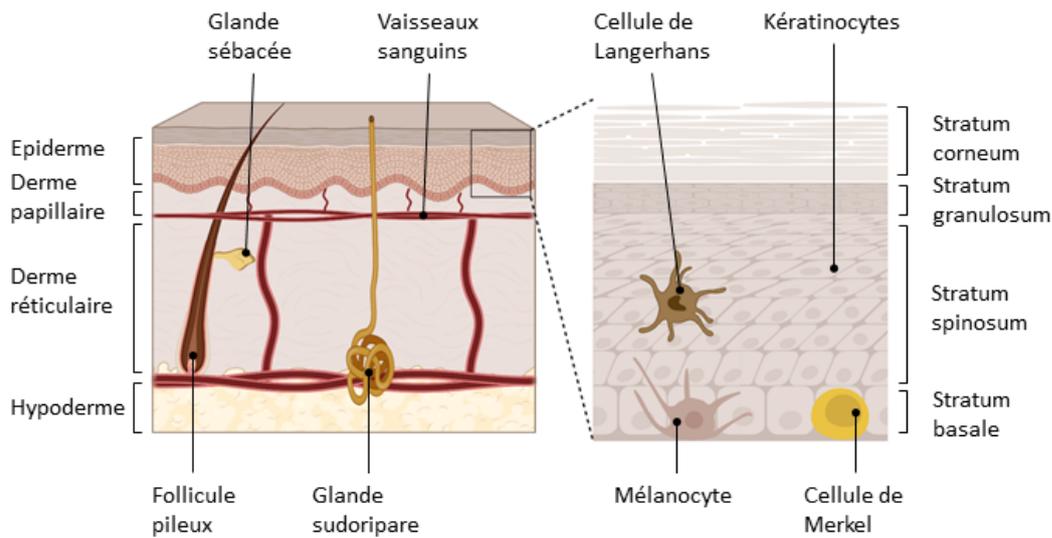


FIGURE 1.15 – Représentation en coupe de la peau humaine. Figure réalisée avec biorender.

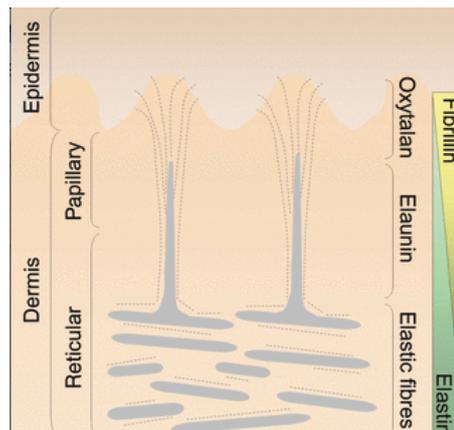


FIGURE 1.16 – Organisation des fibres élastiques dans la peau [133]

(microfibrilles) perpendiculaires à la surface de la peau sous la jonction dermo-épiderme, puis de fibres d'élaunine (microfibrilles et élastine) et enfin de fibres élastiques matures (figure 1.16) [4].

1.2.2 Le processus de cicatrisation

Lorsqu'une blessure porte atteinte à l'intégrité de la peau, elle a la capacité de se régénérer. Ce processus de cicatrisation se déroule en trois étapes : une phase d'hémostase et d'inflammation (de 4 à 6 jours), suivie d'une phase de prolifération cellulaire et de dépôt d'une matrice temporaire, le tissu de granulation (10 jours) et enfin une maturation et un remodelage du tissu (jusqu'à un an) (figure 1.17) [134].

L'hémostase est la première étape pour arrêter l'écoulement sanguin des vaisseaux

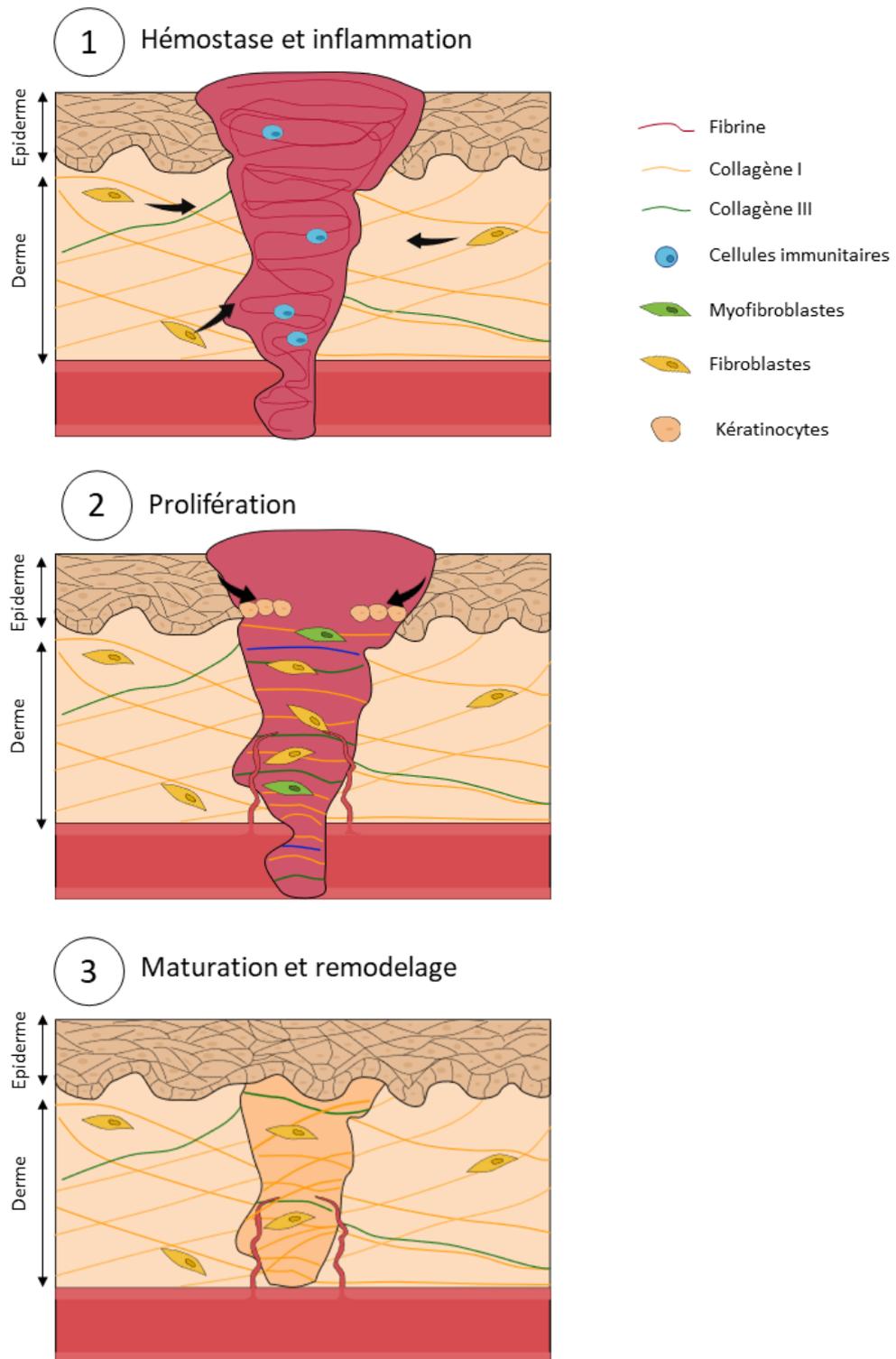


FIGURE 1.17 – Les phases de cicatrisation de la peau.

rompus. La coagulation se produit grâce à l'agrégation de plaquettes qui initient la cascade de coagulation. Le caillot de fibrine formé sert de support pour l'invasion par les cellules immunitaires, les fibroblastes et les cellules endothéliales (qui forment la paroi des vaisseaux). La phase d'inflammation est essentielle pour le nettoyage de la plaie, la synthèse de matrice et la prolifération des cellules. Les macrophages recrutés sur le site sécrètent des facteurs qui activent l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux) et contribuent au recrutement des fibroblastes et des cellules endothéliales. Les fibroblastes migrent au niveau de la plaie depuis les tissus environnants pendant que les cellules endothéliales prolifèrent depuis les capillaires intacts autour de la plaie. Les cellules épithéliales des bords de la plaie prolifèrent et migrent pour recréer une barrière contre la perte de fluide et l'invasion bactérienne. Les facteurs de croissance sécrétés par les macrophages activent les fibroblastes. Ceci leur permet de sortir de leur phase de quiescence et démarrer une phase de prolifération [134].

L'étape de dépôt du collagène est la phase la plus critique de la cicatrisation. En effet, la vitesse de sécrétion, la qualité et la quantité totale de matrice déposée déterminent la résistance de la future cicatrice. La composition de la matrice évolue au cours du temps : initialement, elle est composée principalement de fibrine et de fibronectine issues de la phase d'hémostase. Ensuite, des GAG et protéoglycanes sont synthétisés et servent de support pour la sécrétion de matrice et son remodelage. Dans le tissu de cicatrisation transitoire, la quantité de collagène III est élevée (30 %) puis diminue au cours de la maturation du tissu. La synthèse de collagène III coïncide avec celle de la fibronectine. L'augmentation de la sécrétion de collagène peut durer jusqu'à 5 semaines après l'apparition de la plaie. Elle est due à l'augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'à une augmentation de la quantité de collagène produite par chaque cellule. Dans la zone de cicatrisation, les fibres de collagène sont fines et parallèles à la surface alors que dans les zones saines, les fibres sont plus épaisses et forment une structure tissée (*basket-weave pattern*) [132, 135]. Ces fibres s'épaississent progressivement et s'organisent le long de la ligne de tension de la cicatrice. Ce changement est accompagné par une augmentation de la tension de la cicatrice. Le collagène produit lors de la phase de granulation est différent du collagène des tissus sains : il subit plus d'hydroxylation et glycosylation des résidus lysine. C'est pour cela que les fibres des plaies profondes guéries ne retrouvent jamais l'organisation du derme originel. La détérioration du collagène présent dans la plaie intervient dès la phase d'inflammation par les MMP sécrétées par les macrophages et les fibroblastes. L'accumulation de matrice est alors le résultat d'un équilibre entre dégradation de la matrice existante et sécrétion d'une nouvelle matrice [132].

La phase de contraction de la matrice extracellulaire contribue à rapprocher les deux bords de la plaie pour la fermer. Il existe deux hypothèses sur l'origine de la contraction de la plaie : une contraction provoquée par des fibroblastes différenciés en myofibroblastes, ou la réorganisation des fibres causées par la migration des fibroblastes. Les myofibroblastes sont des fibroblastes aux capacités contractiles plus élevées qui expriment les fibres d' α -SMA. La présence de ces fibres est détectée à partir de 6 jours dans une plaie et diminue

à partir de 4 semaines. Ensuite, les cellules meurent par apoptose, ce qui réduit la densité cellulaire du tissu [132]. Si les myofibroblastes restent activés, cela entraîne une formation excessive de tissu appelé fibrose [136].

1.2.3 les propriétés mécaniques de la peau

Les propriétés mécaniques de la peau dépendent de la zone étudiée, du type et de l'orientation de la sollicitation (tableau 1.6) [137].

Méthode	<i>In vivo/ex vivo</i>	Module d'élasticité	Référence
Traction	<i>Ex vivo</i>	70 - 160 MPa	[138, 139]
Traction	<i>In vivo</i>	0,3 - 20 MPa	[140]
Indentation	<i>In vivo</i>	4 - 89 kPa	[141-144]
Succion	<i>In vivo</i>	25 - 260 kPa	[145-147]
Torsion	<i>In vivo</i>	20 - 1120 kPa	[148, 149]
AFM	<i>Ex vivo</i>	0,1 - 322 kPa	[150, 151]

TABLE 1.6 – Modules d'élasticité de la peau mesurée par différentes méthodes de caractérisation mécanique.

Il est notable que les valeurs de module d'élasticité rapportées varient de plusieurs ordres de grandeur selon la méthode de mesure. *In vivo*, la peau est soumise à des forces de tension. Lorsqu'elle est excisée, lors d'une biopsie par exemple, ces forces de tension disparaissent et la peau se rétracte [152]. Cela explique en partie les différences observées entre les mesures *in vivo* et *ex vivo*.

Contrairement à la succion et à la torsion, l'indentation est une méthode qui ne nécessite pas l'application de pré-contraintes. Cela réduit donc l'erreur de mesure liée aux conditions expérimentales [141]. De plus, cette méthode a été appliquée aussi bien *in vivo* que sur les modèles *in vitro*. Dans la suite de ces travaux, ce seront donc ces valeurs qui seront considérées comme référence.

1.2.4 Les modèles de peau *in vitro*

Comme pour les cellules de l'os, les cellules de la peau ont des morphologies et des comportements différents de ceux observés *in vivo* lorsqu'elles sont cultivées sur des supports en 2D [127]. Les souris ont été largement utilisées comme modèle animal bien qu'il existe de nombreuses différences entre la peau humaine et murine. L'épiderme et le derme de la souris sont plus fins que ceux des humains et les follicules pileux sont plus abondants. L'organisation des fibres de collagène dans le derme diffère entre les

deux espèces [135]. Le processus de cicatrisation est également plus efficace chez la souris que chez l'humain où il y a persistance d'une cicatrice après une plaie profonde [153]. Cela justifie le développement de modèles *in vitro* 3D pour étudier le comportement du tissu humain. Comme pour l'ingénierie tissulaire de l'os, les modèles de peau ont des applications en recherche pour étudier la physiologie et les pathologies de la peau, ou bien en médecine régénérative pour le traitement des plaies profondes, notamment dans le cas des grands brûlés [127].

Les premières cultures *in vitro* en trois dimensions ont été proposées en 1948 avec le maintien d'explants de biopsie en culture [154]. Ces techniques ont ensuite évolué et en 1971, Karasek et Charlton [155] ontensemencé des kératinocytes sur un hydrogel de collagène. Quelques années après, Bell *et al* ont moulé des hydrogels de collagène contenant des fibroblastes en suspension et les ont conservés plusieurs jours en culture [156].

Les modèles de peau sont formés par une co-culture de fibroblastes et de kératinocytes en deux couches distinctes [127]. Les tissus sont généralement maturés à l'interface air/liquide pour permettre la stratification de l'épiderme. Cela peut être réalisé en ensemençant des kératinocytes au sommet de plusieurs couches de fibroblastes superposées les unes sur les autres. Pour des modèles ayant un volume plus important, les fibroblastes peuvent être ensemençés sur un scaffold au sein duquel ils vont sécréter leur matrice [157, 158] ou directement ensemençés dans un hydrogel de collagène [159]. Les kératinocytes sont ensuite déposés sur cet équivalent de derme.

De même que pour les modèles de tissus osseux, les hydrogels peuvent être formés par moulage, ou bien par bio-impression [127].

Les hydrogels de collagène, composés à 99 % d'eau, ont pendant longtemps été le modèle de référence pour la production d'équivalents de peau [159]. Ils ont permis de comprendre les interactions entre les cellules et leur environnement, notamment avec la matrice environnante en générant des forces de faibles intensité. Cependant, les gels de collagène sont 100 à 1000 fois moins rigides que le collagène natif trouvé dans les tissus conjonctifs. Les fibroblastes dans ces hydrogels génèrent des forces de l'ordre du nanonewton qui sont insuffisantes pour remodeler le collagène natif. Cela est dû à la différence de concentration en collagène : les hydrogels de collagène en contiennent 0,1 à 0,5 % m/v alors que les tissus cibles en contiennent 10 à 20 % [159]. La méthode de biofabrication par compression plastique des hydrogels de collagène permet de retirer l'eau et atteindre ces valeurs cibles. Cette méthode permet également d'augmenter la densité cellulaire sans porter atteinte à la viabilité cellulaire. Après compression, les fibroblastes ne sont plus capables de contracter la matrice. Quand la rigidité augmente suite à l'augmentation de la densité du collagène, les cellules prolifèrent plus que dans les gels mous où elles sont dans un état quiescent [160]. Les hydrogels de collagène sont donc utiles pour étudier certains aspects de la physiologie cutanée, tels que les mécanismes de motilité cellulaire, mais ne sont pas adaptés pour produire des modèles de pathologie

[159].

La bio-impression 3D a aussi récemment été introduite pour produire des modèles de peau. La première démonstration de bio-impression de peau a été réalisée en 2009 [161]. Des couches de précurseur du collagène ont été extrudées et réticulées en augmentant le pH de la solution. Les fibroblastes, en suspension dans du milieu de culture, ont été déposés entre la deuxième et la troisième couche. Des kératinocytes ont été déposés de la même manière sur la huitième couche et recouvert par deux épaisseurs supplémentaires de collagène. Cette méthode a donc permis de produire un modèle de derme et épiderme d'environ 100 μm d'épaisseur. Par la suite, la méthode a été améliorée en utilisant des polymères naturels pour la préparation des hydrogels [162]. Les fibroblastes ont été ensemencés dans un hydrogel réticulé après impression. Les polymères composant les hydrogels couramment utilisés pour l'extrusion, seuls ou en combinaison, sont l'alginate [163, 164], la gélatine [163-166] et le fibrinogène [135, 163, 164, 167]. La bio-fabrication de l'épiderme est réalisée dans un second temps. Les kératinocytes sont déposés à la surface de l'hydrogel. La plupart des modèles se limitent à un derme avec des fibroblastes, surmonté d'un épiderme composé de kératinocytes. Cependant, certaines études récentes ont montré qu'il était possible de reproduire une structure plus complète par l'ajout d'un hypoderme et d'autres types de cellules comme les mélanocytes ou des cellules vasculaires [135].

Les propriétés mécaniques des supports, que ce soient des hydrogels produits par bio-impression ou moulage ou bien des scaffolds, jouent un rôle important dans le comportement des cellules. Pourtant, peu d'études ont caractérisé le comportement mécanique des modèles de tissus cutanés produits (tableau 1.7).

Les valeurs de modules d'élasticité varient selon les techniques de fabrication et les méthodes de caractérisation utilisées. Dans les scaffolds, les cellules évoluent en 2D jusqu'à ce qu'elles soient entourées dans leur propre matrice alors qu'avec le moulage ou la bio-impression, les cellules évoluent au sein d'un hydrogel. Elles ne ressentent donc pas la rigidité du matériau de la même manière. Il semble toutefois que des valeurs de module d'élasticité semblables aux valeurs de la peau (1 - 10 kPa) donnent des résultats satisfaisants en termes de prolifération cellulaire et de sécrétion d'une matrice organique, pour les hydrogels comme pour les scaffolds. La sécrétion de la matrice biologique impacte à son tour les propriétés mécaniques des peaux reconstruites. Cependant, à notre connaissance, aucune étude utilisant des modèles bio-imprimés n'a effectué un suivi des propriétés mécaniques des construits au cours de leur maturation.

Procédé de biofabrication	Matériaux	Méthode de caractérisation mécanique	Module d'élasticité	Résultats	Référence
Scaffold	Collagène, chitosane et GAG	Indentation	$E^* = 14,8$ kPa pour le scaffold acellulaire, 59,1 kPa pour le derme et 160 kPa pour la peau reconstruite. $E_{inst} = 3,8$ kPa pour le scaffold acellulaire, 8,9 kPa pour le derme et 13,4 à 83,3 kPa pour la peau reconstruite	Sécrétion collagène et élastine <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	[158, 168-170]
Moulage et compression plastique	Collagène	Traction	42 kPa à 2305 kPa suivant l'intensité de compression plastique appliquée	Plus de prolifération et de migration des cellules vers les zones les plus rigides après 6 jours de culture	[160, 171]
Bioimpression	Lysat plaquettaire + GelMA	Indentation	5 à 35 kPa selon la concentration en GelMA utilisée	Sécrétion de collagène I et III, élastine et fibronectine	[172]
Bioimpression	UIMA + GelMA	Compression	1 à 12 kPa	Prolifération plus linéaire avec les modules d'élasticité les plus bas, présence d'une phase de délai avec module 12 kPa. Diminution de l'expression des gènes collagène I et collagène III quand les modules augmentent. Sécrétion de collagène I et III, fibronectine et élastine dans tous les construits.	[166]
Scaffold	PCL et miel de grade chirurgical	Traction	2 – 3 MPa	Phase de délai dans la prolifération jusqu'à J7 puis croissance. Pas de différences significatives de module d'élasticité entre les scaffolds	[173]
Scaffold	GelMA	Compression	3 à 40 kPa en fonction de la concentration en GelMA	Plus le scaffold est rigide, plus les fibroblastes se différencient en myofibroblastes	[174]

TABLE 1.7 – Modèles de peau *in vitro* caractérisés mécaniquement

1.3 L'ostéogenèse imparfaite

1.3.1 Qu'est-ce que l'ostéogenèse imparfaite ?

L'ostéogenèse imparfaite (OI) est une maladie rare causée par des mutations génétiques qui affectent le collagène I. Il est estimé qu'un nouveau-né sur 15000 à 20000 est touché par cette maladie [175]. Les principaux symptômes associés à l'OI sont une fragilité accrue des os, qui se traduit par des fractures fréquentes et des déformations osseuses, une petite taille et une masse osseuse plus faible que la normale (figure 1.18). Cependant, le collagène I étant présent dans de nombreux tissus, certains individus ont aussi des manifestations extra-squelettiques telles que la dentinogenèse imparfaite, les sclères bleues, une perte d'audition, une hyper mobilité articulaire... [175].

Actuellement, aucun traitement curatif n'est disponible pour cette pathologie. Les interventions chirurgicales ont pour but de corriger les fractures et les déformations osseuses par l'intermédiaire d'outils orthopédiques. Les traitements médicamenteux sous la forme de bisphosphonates visent à réduire la résorption osseuse, mais leur prise entraîne des effets secondaires indésirables qui peuvent affecter la qualité de vie du patient [176].

La sévérité des symptômes variant d'un patient à l'autre, une première classification a été mise au point par Sillence et ses collègues en 1979 [177]. Cette classification comprend quatre types d'OI, déterminés d'après la gravité des symptômes (nombre de fractures, déformations des os et retard de croissance). Le premier est le type le moins sévère, le type II est létal en périnatal, le type III est le plus sévère compatible avec la vie et le IV est intermédiaire. Cependant, bien que cette classification ait voulu apporter un éclairage sur la diversité des mutations génétiques existantes, il a été découvert par la suite que toutes les mutations génétiques responsables de la maladie ne touchaient pas directement les gènes impliqués dans la synthèse des chaînes de collagène I. Cette classification reflète donc plus les symptômes cliniques que la diversité des mutations génétiques. Des extensions à cette classification ont été apportées au fur et à mesure de la découverte de nouveaux gènes impliqués dans l'OI [178]. Forlino et Marini [176] ont proposé une classification basée sur le métabolisme moléculaire impacté par la mutation (tableau 1.8). En effet, les mutations génétiques impliquées dans la pathologie peuvent impacter différentes étapes de la sécrétion de la matrice extracellulaire, depuis la sécrétion des chaînes de collagène jusqu'à l'assemblage des fibrilles et la minéralisation de la matrice. Le comportement des ostéoblastes peut également être perturbé.

Les mutations sur les gènes *COL1A1* et *COL1A2* qui encodent les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène représentent plus de 80 % des mutations liées à l'OI [176]. Ces mutations provoquent des défauts quantitatifs (seulement 50 % de la quantité normale de collagène est synthétisée) ou bien qualitatifs (la structure primaire de la molécule de collagène est altérée). Les défauts quantitatifs sont responsables des formes modérées d'OI alors que les défauts qualitatifs provoquent des symptômes plus sévères [179]. Les mutations



FIGURE 1.18 – Manifestations cliniques de l’OI : petite taille et déformation des os longs. De gauche à droite et de haut en bas : Guillaume Bats, Michel Petrucciani, une radio montrant la déformation des os longs et Hei Pingping, tous atteints d’OI.

Métabolisme moléculaire impacté	Type Clinique	Gène touché	Protéine touchée
Défaut dans la synthèse, la structure et la maturation des molécules de collagène	OI I, II, III, IV	COL1A1	$\alpha 1(I)$
	OI I, II, III, IV	COL1A2	$\alpha 2(I)$
	OI XIII	BMP1	BMP1
Défaut dans la modification post-traductionnelle du collagène	OI VII	CRTAP	CRTAP
	OI VIII	LEPRE1	P3H1
	OI IX	PP1B	PP1B (CYPB)
	OI XIV	TMEM38B	TRIG-B
Défaut dans l'assemblage des fibrilles de collagène	OI X	SERPINH1	HSP47
	OI XI	FKBP10	KKBP65
	non classé	PLOD2	LH2
Défaut dans la différenciation et le fonctionnement des ostéoblastes	OI XII	SP7	SP7 (Osterix)
	OI XV	WNT1	WNT1
	OI XVI	CREB3L1	OASIS
	OI XVII	SPARC	SPARC (ostéonectine)
Défaut dans la minéralisation	OI XIX	MBTPS2	S2P
	OI V	IFTTM5	BRIL
	OI VI	SERPINF1	PEDF

TABLE 1.8 – Classification de l'OI basée sur les gènes et les fonctions impactées (d'après [176]).

qui affectent les gènes des chaînes du collagène sont des mutations dominantes chez les patients. Cela signifie qu'il suffit qu'un seul des deux allèles du gène soit touché pour que la protéine soit altérée. En revanche, les mutations sur les gènes non collagéniques sont généralement récessives, c'est-à-dire que les deux versions de l'allèle doivent porter la mutation pour qu'elle soit exprimée [175].

1.3.2 Les conséquences de la pathologie sur l'os : de la protéine à l'organe

L'ostéogenèse imparfaite est une pathologie qui affecte le collagène I, composant majeur de la matrice extra-cellulaire osseuse. Les défauts quantitatifs et qualitatifs (tels que décrits dans la section précédente) perturbent l'assemblage du collagène. Ces perturbations se répercutent aux échelles supérieures, jusqu'à provoquer des atteintes à l'échelle de l'organe.

La synthèse de collagène I suit plusieurs étapes (figure 1.19). Le collagène est formé de deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$ constituées d'un long domaine hélicoïdal encadré par deux pro-peptides aux extrémités. Les chaînes nouvellement synthétisées subissent des transformations telles que l'hydroxylation des résidus lysine et proline. Elles s'enroulent ensuite entre elles pour former la structure en triple hélice caractéristique du collagène. A ce stade, on parle de molécules de procollagène. Ces procollagènes sont sécrétés hors de la cellule. Leurs extrémités sont clivées par des protéases, formant ainsi les molécules de tropocollagène. Les fibrilles sont constituées par l'assemblage des molécules de tropocollagène. L'ensemble est stabilisé par la réticulation des molécules de tropocollagène [1, 180].

Dans le cas de l'OI, trois cas différents seront distingués dans cette section : les défauts quantitatifs portés par les gènes *COL1A1* ou *COL1A2* responsables de la synthèse des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$, les défauts qualitatifs portés par *COL1A1* ou *COL1A2*, et les défauts sur les autres gènes (figure 1.20).

Dans le cas des défauts quantitatifs portés par *COL1A1* ou *COL1A2*, la mutation génère un arrêt prématuré de la séquence codant la chaîne $\alpha 1$ ou $\alpha 2$. Ce défaut fonctionnel majeur bloque la synthèse de la protéine. En conséquence, seulement 50 % de la quantité normale de collagène I est synthétisée mais les protéines ont une structure correcte [181].

Dans le cas des OI de type II-IV, les molécules de collagène synthétisées ont une structure primaire incorrecte. La substitution de l'un des acides aminés, généralement une glycine, est une des causes fréquentes des défauts de structure observés. En effet, la glycine est présente tous les trois résidus dans la chaîne à cause des contraintes géométriques causées par l'enroulement en hélice : c'est le seul acide aminé suffisamment petit pour rentrer dans l'espace restreint au centre de la triple hélice [182, 183]. En conséquence, la substitution d'une glycine par un autre acide aminé interfère avec la formation de la triple hélice, ce qui ralentit le processus et expose les molécules plus longtemps aux

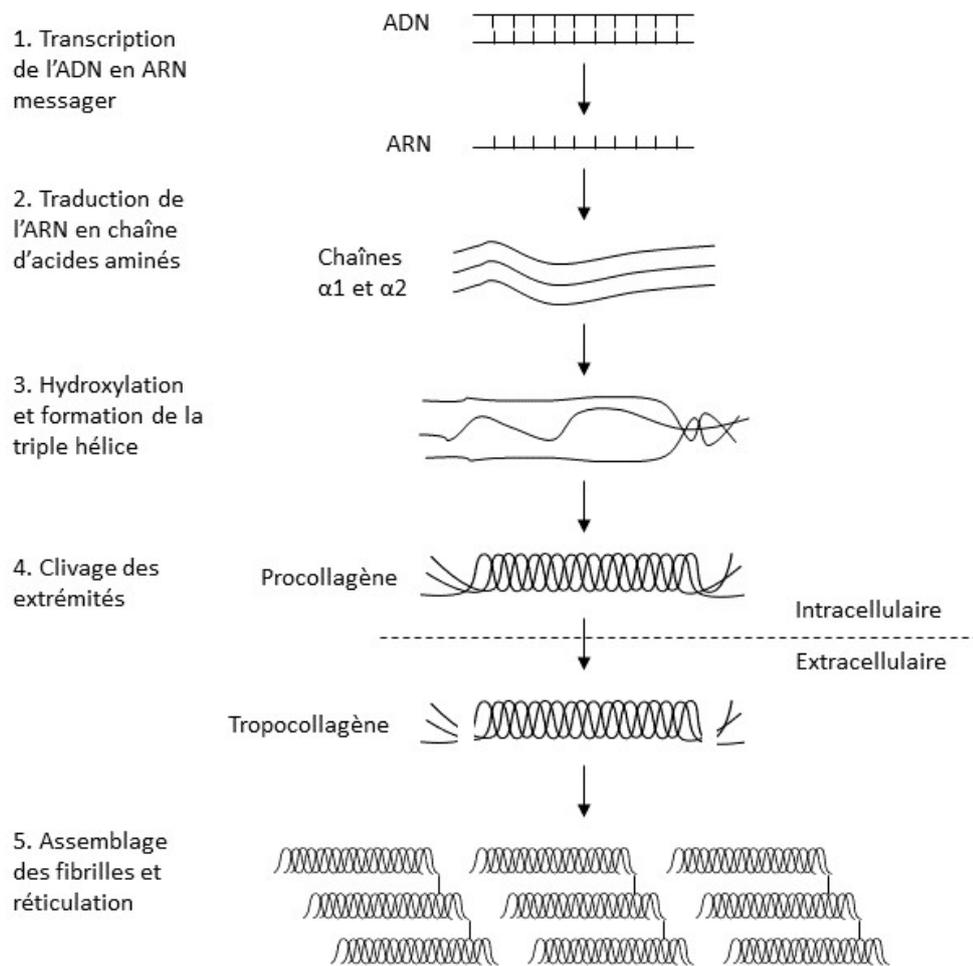


FIGURE 1.19 – Synthèse et assemblage des fibrilles de collagène.

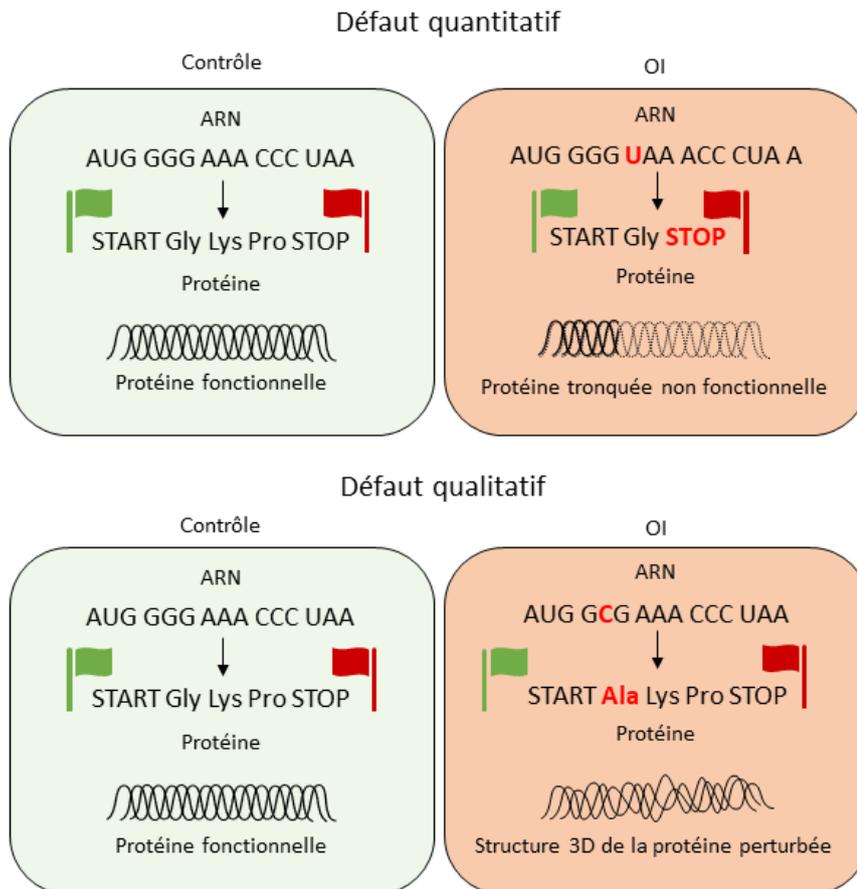


FIGURE 1.20 – Conséquences des mutations génétiques sur la structure de la protéine de collagène. L'ADN est composé d'une séquence de nucléotides. Lorsqu'un gène est exprimé pour la production d'une protéine, l'ADN est transcrit en ARN messager, qui est lui-même traduit en protéines. Les protéines sont des séquences d'acide aminé, dont chacun est codé par un ensemble de trois nucléotides appelé triplet ou codon. Chaque gène est également encadré par un codon d'initiation qui marque le début du gène et un codon stop qui marque sa fin. Si un nucléotide est inséré ou supprimé, cela va entraîner un décalage du cadre de lecture qui peut provoquer l'apparition d'un codon stop prématuré : la protéine produite est ainsi tronquée et généralement non fonctionnelle. Une substitution d'un nucléotide par un autre peut entraîner un changement d'acide aminé et ainsi modifier la protéine produite.

modifications post-traductionnelles. Cela a un impact sur la structure 3D de la protéine [184]. Les conséquences de la substitution diffèrent selon le gène touché, les mutations sur *COL1A1* étant généralement plus sévères : 36 % des substitutions sur *COL1A1* sont létales contre 19 % sur *COL1A2* [181]. La sévérité de la mutation dépend à la fois de sa position et de l'acide aminé substitué. De plus, les conséquences de la substitution d'une même glycine peuvent fortement varier suivant l'individu. Ainsi, Marini *et al* [182] ont identifié 35 substitutions qui ont des conséquences à la fois létales et non létales sur $\alpha 1(I)$ et 8 sur $\alpha 2(I)$.

Enfin, dans le cas des OI récessives, les mutations touchent généralement les protéines qui interagissent avec le collagène lors de sa maturation. Ces mutations perturbent donc les modifications post-traductionnelles du collagène, notamment le clivage des extrémités N et C-terminales. Elles provoquent également des surmodifications des molécules [175, 176, 181].

Les défauts structurels des molécules de procollagène perturbent leur assemblage en fibrilles [183, 184]. Ce défaut d'assemblage provoque par la suite des modifications de la composition et de la structure de la matrice extracellulaire. Ainsi, la matrice extracellulaire osseuse des patients OI a une densité minérale 1,1 fois plus élevée que celle des patients contrôles [185]. Malgré cette minéralisation plus élevée, le module d'élasticité des os des patients OI, mesurée à l'échelle microscopique, est plus faible d'environ 15 % que celui des patients contrôles [185, 186].

Il a été montré que le remodelage osseux est également perturbé, avec une résorption de la matrice par les ostéoclastes supérieure à la sécrétion de matrice par les ostéoblastes [187]. Ceci se traduit notamment par une porosité de la matrice près de 10 fois plus élevée dans l'os des patients OI que pour les patients contrôles (figure 1.21) [186].

A l'échelle macroscopique, conséquence directe de la porosité plus élevée, la densité minérale osseuse des patients OI est plus faible que celle des patients contrôles [186]. Le module d'élasticité et la contrainte maximale à la rupture sont deux fois plus faibles dans les os des patients OI que des patients contrôles [186]. Cela explique la fragilité accrue des os OI et les phénomènes de déformations des os longs observés chez ces patients.

1.3.3 Modèles d'étude de l'ostéogenèse imparfaite

1.3.3.1 Modèles animaux

Parmi les modèles animaux les plus utilisés pour étudier l'OI, les plus fréquents sont la souris et le poisson-zèbre (tableau 1.9) [188]. Les mutations génétiques responsables de l'OI peuvent être spontanées mais sont généralement induites par édition génétique. La plupart des modèles miment la maladie en reproduisant certaines conséquences sur le squelette. Cependant, seuls quelques modèles reproduisent une mutation observée chez l'humain.

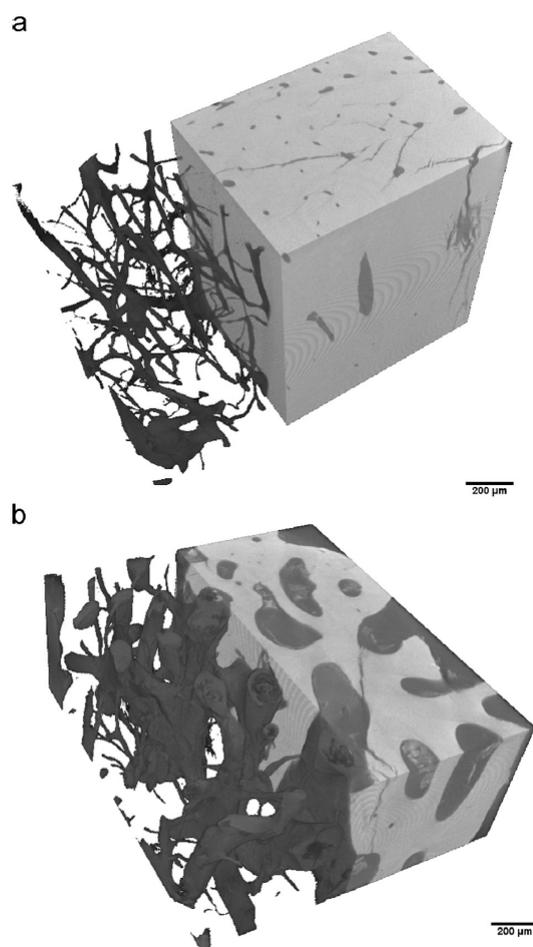


FIGURE 1.21 – Images d’os cortical reconstruites par tomographie à rayons X [186]. a : Os d’un patient contrôle. b : Os d’un patient porteur de la pathologie OI. L’image est inversée sur la partie gauche pour montrer uniquement la porosité.

Modele	Mutation génétique	Phénotype	Manifestations squelettiques	Référence
souris Oim/Oim	Mutation spontanée sur Colla2 : pas de synthèse de la chaîne alpha2	OI III	Masse osseuse réduite, fractures fréquentes, synthèse de collagène réduite, module d'élasticité des os réduits, collagène homotrimérique (3 chaînes alpha-1), différenciation ralentie des ostéoblastes	[189-193]
souris Brtl	Colla1 Gly349Cys	OI IV	Fragilité osseuse et fractures mais s'améliore après la puberté.	[194-198]
souris <i>Colla2G610C</i> / \pm population Amish)	Colla2 G610C (mutation identique à celle observée dans la population Amish)	OI I/IV	Masse et résistance osseuses réduites.	[199, 200]
souris Aeg2	Colla1 nouveau site d'épissage	OI II (homozygote)/III (hétérozygote)	Souris homozygotes décèdent en périnatal. Souris homozygotes ont un remodelage plus élevé, un réseau de collagène perturbé et des déformations des os longs.	[201]
Souris Mov13	KO colla	OI II si homozygote, OI I si hétérozygote	Production de 50% de moins de collagène I que dans les souris contrôles.	[202-204]
Souris colla1 ^{Jrt+}	Colla1 modification d'un site d'épissage	OI IV et syndrome Ehler-Danlos	Fractures spontanées, déformations osseuses, douleur, taille réduite.	[205-207]
Zebrafish Med-/-	Colla1 substitution (c.888Ga) homozygote	OI I-IV	Ossification retardée et densité minérale osseuse réduite.	[208, 209]
Zebrafish Chi	Colla1 substitution G par A (c. 2207GA) (glycine remplacée par aspartate)	OI I - IV	Croissance osseuse réduite, os déformés.	[210]

TABLE 1.9 – Modèles animaux porteurs de mutations uniquement sur colla1 ou colla2 (OI I – IV)

1.3.3.2 Modèles *in vitro*

Créer un modèle *in vitro* de l'OI satisfaisant suggère d'avoir accès à des cellules présentant les mutations d'intérêt. Ceci est possible suite à un prélèvement sur patient ou bien par édition génétique de cellules saines.

a) Cellules de patients porteuses d'une mutation spontanée

Les cellules OI les plus étudiées *in vitro* sont les ostéoblastes, pour leur lien direct avec la pathologie, et les fibroblastes, pour leur facilité d'accès et leur capacité à produire du collagène I. Les cellules de patients OI peuvent être extraites de biopsie de peau ou de déchets opératoires osseux. Les fibroblastes de patients OI cultivés *in vitro* montrent moins d'altérations de leur comportement que les ostéoblastes OI [211-213]. Ceci est cohérent avec le peu de manifestations cliniques de la pathologie observées *in vivo* dans la peau des patients OI.

Les études qui décrivent la sécrétion de collagène I par ces deux types cellulaires ont permis de comprendre les mécanismes à l'origine de la pathologie (tableau 1.10). Les molécules de procollagène mutées sont partiellement dégradées dans le réticulum endoplasmique, mais une portion de ces molécules échappe à la dégradation et se retrouve incorporée dans la matrice extracellulaire [214]. Cela explique un taux de synthèse de collagène I réduit dans les cellules OI par rapport aux cellules contrôles.

Il est notable que la capacité proliférative de cellules OI semble être affectée. En effet, la densité maximale des ostéoblastes des patients OI *in vitro* est deux fois plus faible que pour ceux des patients contrôles [213]. En revanche, *in vivo*, la densité d'ostéoblastes est 1,5 à 4 fois plus élevée chez les patients OI que chez les patients contrôles [186, 215]. Il existe ici une incohérence entre les modèles d'étude *in vitro* 2D classiques et les résultats *in vivo*. Cela suggère que l'absence de contraintes biomécaniques et d'environnement 3D fournissant des points d'ancrage tridimensionnels ont un impact sur le développement de la pathologie [211].

Cellules	Origine des cellules	Méthode de culture	Marqueurs étudiés	Résultats	Référence
Fibroblastes	Biopsies de patients OI et contrôles	Culture 2D	Sécrétion du collagène	Il n'y a pas de différence dans la synthèse totale de collagène. Certaines souches de fibroblastes OI ont un ratio collagène I/collagène III différent.	[216]
Fibroblastes	Biopsies et prépuces de patients OI et contrôles	Culture 2D	Sécrétion du collagène	Les fibroblastes contrôles sécrètent jusqu'à 2 fois plus de collagène que les fibroblastes OI entre 2 et 9 ans.	[217]
Fibroblastes et ostéoblastes	Fibroblastes issues de biopsies de peau, ostéoblastes issus de prélèvements de la crête iliaque	Cultures 2D	Prolifération cellulaire et sécrétion du collagène	Le taux de synthèse du collagène est plus élevé chez les fibroblastes et ostéoblastes contrôles, lui-même supérieur à celui des fibroblastes OI, qui est supérieur à celui des ostéoblastes OI	[212]
Ostéoblastes	ostéoblastes issus d'échantillons d'os trabéculaire	Culture 2D	Sécrétion du collagène et de protéines non collagéniques	Le taux de synthèse de protéines totales est identique entre les cellules OI et contrôles. La composition de la matrice extracellulaire OI est similaire à celle des cellules foetales	[218]

Cellules	Origine des cellules	Méthode de culture	Marqueurs étudiés	Résultats	Référence
Ostéoblastes et fibroblastes	Ostéoblastes issus de déchets osseux opératoire, fibroblastes issus de biopsies	Cultures 2D	Prolifération cellulaire	Les courbes de prolifération des fibroblastes OI et contrôles sont identiques. A l'inverse, la prolifération est plus lente et la densité maximale des ostéoblastes OI est moins élevée que pour les ostéoblastes contrôles. Les fibroblastes sont moins sensibles que les ostéoblastes aux mutations du collagène.	[213]
CSM	CSM de la moelle osseuse	Culture 2D	Expression de gènes	Les CSM OI surexpriment des gènes associés à l'adipogénèse.	[219]
OB	ostéoblastes issus de déchets opératoires	Cultures 2D	Sécrétion du collagène I	Les ostéoblastes des patients OI sécrètent moins de collagène que les ostéoblastes contrôles.	[220]
Fibroblastes	Biopsies de peau et prépuces	cultures 2D	Histologie et sécrétion du collagène dans les prélèvements osseux et sécrétion du collagène par les fibroblastes	La densité de cellules est plus élevée dans les prélèvements osseux OI par rapport aux contrôles. La sécrétion de collagène III et V par les fibroblastes est supérieure dans les cellules OI.	[215]
Fibroblastes	Biopsies ou prépuces	Cultures 2D	Prolifération cellulaire	Les fibroblastes OI mettent plus longtemps à atteindre le plateau et leur densité est plus faible.	[221]

Cellules	Origine des cellules	Méthode de culture	Marqueurs étudiés	Résultats	Référence
Fibroblastes et ostéoblastes	ostéoblastes issus de déchets osseux opératoire, fibroblastes issus de biopsies	Cultures 2D	Sécrétion de collagène	Le collagène sécrété par les ostéoblastes et fibroblastes OI comporte à la fois des chaînes normales et des chaînes mutées. Les ostéoblastes sécrètent plus de chaînes mutées que les fibroblastes	[211]
Fibroblastes	Biopsies	Cultures 2D	Sécrétion de collagène I et III et d'acide hyaluronique	Le ratio de sécrétion du collagène I/ collagène III et la synthèse d'acide hyaluronique sont plus élevés dans les cellules OI.	[222]

TABLE 1.10: Études *in vitro* de cellules porteuses d'une mutation associée à l'OI.

b) Édition génétique : induction de la mutation

L'édition génétique consiste à modifier la séquence de nucléotides d'un gène. Ainsi, il est possible d'insérer ou de supprimer des nucléotides au sein de la séquence d'un gène par biologie moléculaire. Ceci peut entraîner un décalage du cadre de lecture et provoquer l'apparition d'un codon stop prématuré, ainsi la protéine produite est tronquée et généralement non fonctionnelle. Une substitution de nucléotide par un autre peut entraîner une substitution d'acide aminé et ainsi modifier la protéine produite.

Plusieurs techniques de manipulation du génome existent, mais la plus récente et la plus utilisée est la technique d'édition génétique par CRISPR/Cas9 [223, 224]. A l'origine, le complexe CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-Associated Proteins 9) était un mécanisme de défense des bactéries pour éliminer les éléments génétiques étrangers [225]. Il est composé d'une endonucléase (enzyme capable de cliver l'ADN) et d'un ARN guide. Le site de liaison de la protéine Cas9 à l'ADN dépend de la séquence de l'ARN guide et de la présence d'un motif PAM (protospacer adjacent motif) de quelques nucléotides qui dépend de la nucléase choisie. Pour spCas9, qui est une endonucléase couramment utilisée, le site PAM est constitué de trois nucléotides NGG, où N désigne n'importe lequel des quatre nucléotides existant (A, C, G, T), et se retrouve toutes les 8 à 12 paires de base dans le génome humain. Le clivage de l'ADN par spCas9 a lieu à 3 paires de base du site PAM.

Les avantages du complexe CRISPR/Cas9 par rapport aux autres techniques d'édition génétique résident dans la facilité de personnalisation du site de coupure (en modifiant la séquence de l'ARN guide), son efficacité supérieure aux autres techniques d'édition génétique et la possibilité d'éditer le génome à plusieurs endroits en même temps [225]. Cependant, il existe aussi certaines contraintes à prendre en compte lors du choix de la séquence de l'ARN guide : le contenu en nucléotides G et C doit être entre 40 et 80 % [226, 227] et la prédiction de mutations hors cible doit être faible ou nulle. En effet, les ARN guides peuvent se lier à des séquences d'ADN qui sont très proches de la cible. Ceci provoquerait alors une mutation non souhaitée [228]. Il est donc nécessaire de choisir une séquence d'ARN qui minimise le risque de mutation hors cible.

La réparation de l'ADN après coupure par la nucléase peut se faire selon deux voies : la jonction d'extrémités non homologues (Non Homologous End Joining, NHEJ) et la recombinaison homologue (Homology Directed Repair, HDR) (figure 1.22). La recombinaison homologue a lieu quand une séquence d'ADN modèle, dont les extrémités correspondent à la séquence ADN autour du site de coupure de l'enzyme, est fournie pour la réparation [224]. C'est cette méthode qui est utilisée pour introduire une mutation ponctuelle précise. L'efficacité de cette réparation dépend de la cellule, de la zone cible et de la position de la mutation à insérer par rapport au site de coupure : le taux de correction d'une seule paire de base est divisé par 4 quand elle est située à 100 paires de base du site de coupure [225]. Cette méthode peut être utilisée pour insérer des grandes séquences, comme un gène codant pour une protéine fluorescente ou un gène de résistance

à un antibiotique [224].

Si la méthode permet de corriger les mutations génétiques dans les cellules de patient [229, 230], elle peut également être utilisée pour induire une mutation associée à l'OI (tableau 1.11).

La méthode CRISPR/Cas9 semble prometteuse pour créer des modèles cellulaires OI. Cependant, à l'heure actuelle, aucun modèle ne reproduit une mutation rapportée chez un patient OI III. Ces modèles sont pourtant d'intérêt car ils permettent une comparaison directe entre les cellules mutées et leur équivalent contrôle. De plus, cette méthode permet de contourner certains inconvénients associés à l'utilisation de cellules primaires, tels que la durée de vie limitée et le faible nombre de cellules obtenues par extraction des tissus osseux [233].

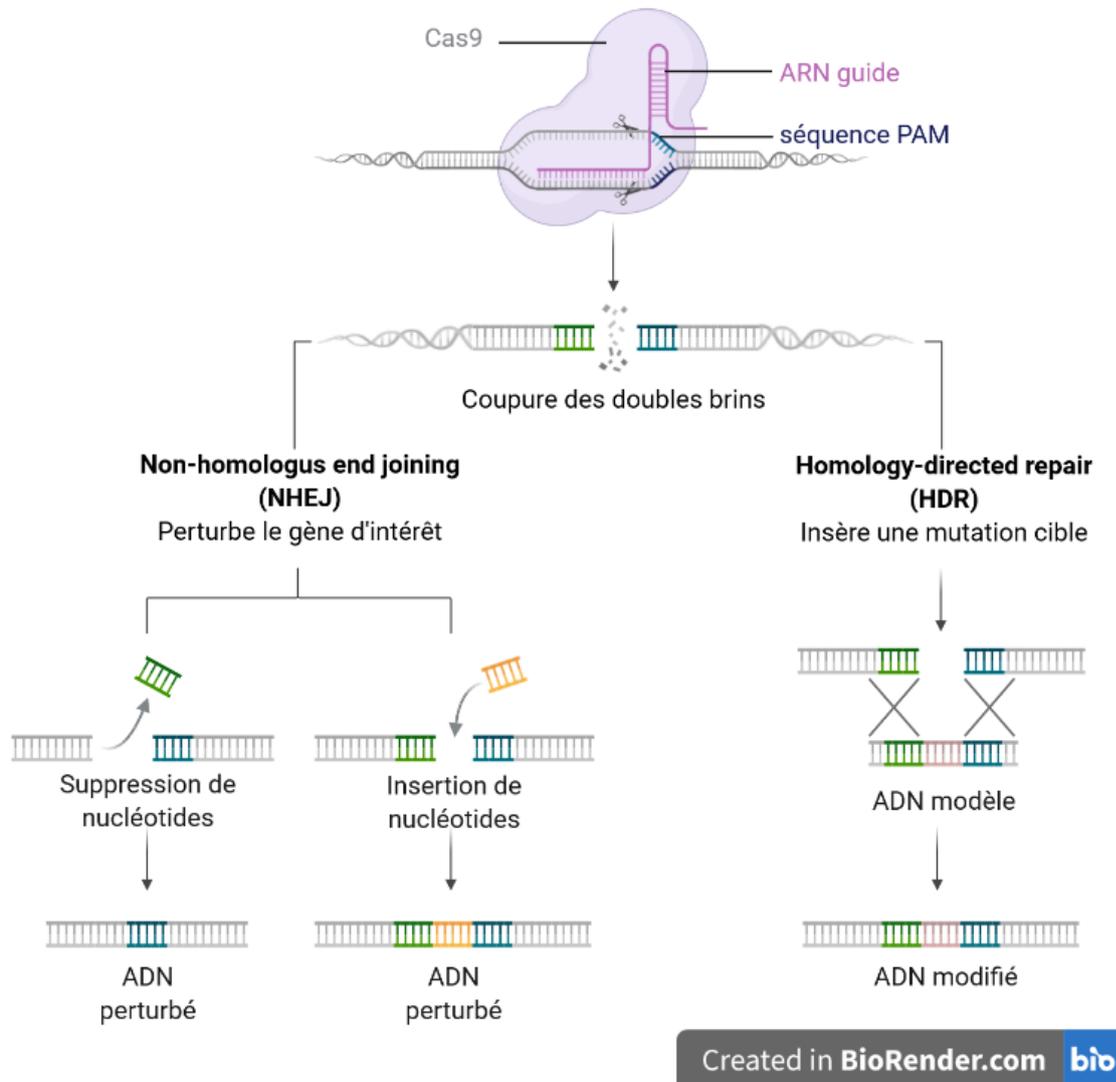


FIGURE 1.22 – Édition génétique par CRISPR/Cas9. La réparation de l'ADN après coupure par la nucléase peut se faire selon deux voies : la jonction d'extrémités non homologues (Non Homologous End Joining, NHEJ) et la recombinaison homologue (Homology Directed Repair, HDR) . La jonction d'extrémités non homologues se produit lors d'une réparation spontanée de l'ADN après coupure par la nucléase. Cette réparation introduit généralement une insertion ou une suppression de nucléotides qui provoquent un décalage du cadre de lecture et souvent l'inactivation du gène [224, 228]. La recombinaison homologue a lieu quand une séquence d'ADN modèle, dont les extrémités correspondent à la séquence ADN autour du site de coupure de l'enzyme, est fourni pour la réparation [224].

Cellules	Mutation génétique	Phéno- type	Impact sur le comportement cellulaire	Réfé- rence
iPSC	Insertion d'un nucléotide supplémentaire (c.3969_3970insT) qui crée un codon stop prématuré (hétérozygote)	OI I	Pas d'impact sur la différenciation dans les trois feuilletts (mésoderme, endoderme, ectoderme)	[231]
Cellule embryonnaire humaine	KO homozygote <i>COL1A2</i>	NR	Pas d'impact sur la différenciation dans les trois feuilletts (mésoderme, endoderme, ectoderme)	[232]
hFOB 1.19	KO <i>TMEM38B</i>	OI XIV	Réduction de l'expression de marqueurs OB précoces et de la synthèse de collagène, prolifération lente, minéralisation retardée	[233]
Fibroblastes de peau	<i>IFTTM5</i> (c.119C>T)	OI VI	Réduction de l'expression du gène <i>SERPINF1</i> (phénotype OI VI + dysplasie osseuse)	[234, 235]

TABLE 1.11 – Cellules modifiées par CRISPR/Cas9 pour porter une mutation génétique associée à l'OI. iPSC : cellule souche pluripotente induite. NR : non renseigné

Conclusion et objectifs

Dans ce chapitre, nous avons présenté la composition et l'organisation du tissu osseux à plusieurs échelles. Nous avons présenté les grands processus au cours desquels la matrice osseuse est synthétisée : le remodelage osseux, la croissance et la réparation de fracture. Ces caractéristiques nous ont amené à présenter les différents modèles existants pour l'étude *in vitro* du tissu osseux. Bien que la bio-impression soit de plus en plus utilisée, aucune étude utilisant ce procédé n'a montré à ce jour de différenciation complète d'ostéoblastes en ostéocytes.

Nous avons ensuite présenté la structure d'un second tissu riche en collagène I : la peau. Le principal processus de synthèse de matrice extracellulaire au sein de la peau est la réparation de plaie. Les modèles *in vitro* utilisant des scaffolds ou des hydrogels ayant des modules d'élasticité du même ordre de grandeur que la peau *in vivo* semblent donner des résultats satisfaisants en termes de sécrétion de matrice. Ce sont donc ces valeurs de module d'élasticité qui seront ciblées lors du travail sur la bio-impression de fibroblastes (chapitre 5).

L'ostéogenèse imparfaite et ses conséquences sur la matrice extracellulaire ont également été présentées. Les modèles animaux sont couramment utilisés pour comprendre les mécanismes de cette pathologie. Néanmoins, ils ne sont pas satisfaisants pour reproduire fidèlement la physiologie humaine. L'utilisation de cellules de patients a permis d'améliorer les connaissances sur l'impact des mutations génétiques sur le comportement cellulaire. Cependant, des différences de comportement, notamment en termes de prolifération, ont été observées entre les modèles *in vivo* et *in vitro*. Ceci est très certainement dû aux types de modèles *in vitro* utilisés (cultures 2D) qui ne permettent pas de reconstituer la complexité des stimulations environnementales subies par les cellules *in vivo* (interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire, adhésion tridimensionnelle, biomécanique). Il paraît donc nécessaire de développer des modèles *in vitro* 3D pour étudier le comportement des cellules porteuses de la pathologie.

Enfin, nous avons présenté la manipulation génétique par CRISPR/Cas9 comme une technique prometteuse pour permettre l'étude de l'impact d'une mutation précise sur la physiologie des cellules OI. En effet, très peu de modèles cellulaires OI sont disponibles à l'heure actuelle, et aucun ne reproduit une mutation associée à l'OI de type III. Un tel modèle faciliterait l'étude des cellules OI *in vitro*.

La problématique qui a dirigé ces travaux était la suivante : **peut-on créer des modèles *in vitro* de tissus osseux et de derme qui reproduisent les altérations des propriétés mécaniques causées par l'ostéogenèse imparfaite ?** L'analyse de la littérature a mis en avant certaines lacunes qu'il convient de combler pour pouvoir répondre à cette question. Afin de répondre à cette problématique scientifique nous avons défini plusieurs objectifs :

- dans le chapitre 3, nous chercherons à obtenir des hydrogels bio-imprimables avec

- différentes propriétés mécaniques qui permettront de retranscrire les conditions mécaniques environnementales perçues par les cellules *in vivo* ;
- dans le chapitre 4, nous déterminerons l'impact des procédés de bio-fabrication, de l'origine des cellules ainsi que des propriétés mécaniques des hydrogels sur la différenciation d'ostéoblastes en ostéocytes dans un hydrogel bio-imprimable afin de déterminer s'il est possible de reconstituer des modèles de tissu osseux *n vitro* représentatifs ;
 - dans le chapitre 5, nous étudierons l'impact des propriétés mécaniques des hydrogels sur le comportement des fibroblastes, et de la même façon, la représentativité des modèles *in vitro* générés ;
 - dans le chapitre 6, nous évaluerons l'interaction entre les cellules et les biomatériaux, et en particulier leurs effets sur les caractéristiques mécaniques des construits ;
 - le chapitre 7 sera consacré au développement de modèles cellulaires porteurs d'une mutation observée chez des patients atteints d'OI.

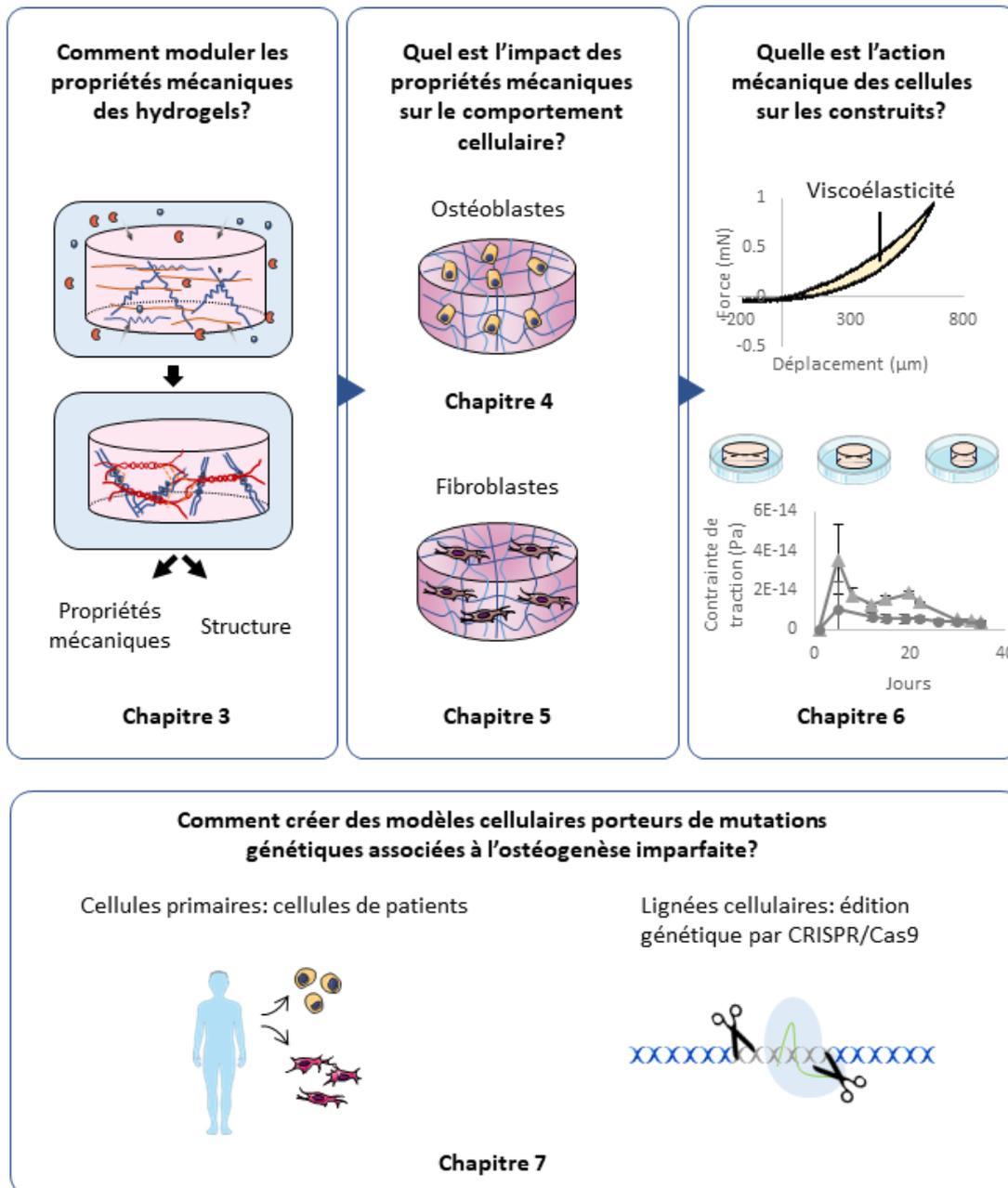


FIGURE 1.23 – Problématiques abordées dans ce travail de thèse.

Chapitre 2

Protocoles

2.1 Cultures cellulaires

2.1.1 Modèles de tissus osseux

Plusieurs sources de cellules ont été utilisées pour les modèles de tissu osseux : les ostéoblastes primaires humains, les cellules stromales mésenchymateuses de moelle osseuse, les MG-63, les MC3T3 et les Y201. Le tableau 2.1 synthétise les conditions de culture spécifiques à chaque source de cellules.

Les ostéoblastes primaires humains (PromoCell #C-12720) ont été extraits d'os trabéculaire de tête fémorale. Leur phénotype a été validé par leur capacité à produire une matrice minéralisée et à sécréter de l'ALP. Les cellules ont été cultivées en flasque avec du DMEM à faible glucose (Dutscher #L0064) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (PAN-Biotech #500105), 2 mM de L-Glutamine (PAN-Biotech #P04-80100) et 50 µg/mL d'acide ascorbique ajouté fraîchement à chaque changement de milieu (Sigma #A8960).

Les cellules stromales de moelle osseuse (BM-MSC pour « bone marrow mesenchymal stem cells ») (PromoCell #C-12974) ont été cultivées en flasque dans un milieu propriétaire commercialisé par PromoCell « Mesenchymal stem cell growth medium » (#C-28009).

Les MG-63 sont des cellules de lignées établies à partir d'un ostéosarcome. Elles ont été fournies par le Dr Jérôme Josse (CIRI-Lyon). Elles ont été cultivées en flasque avec du DMEM à faible glucose (Dutscher #L0064) supplémenté avec 10 % de SVF (PAN-Biotech #500105) et 2 mM de L-Glutamine (PAN-Biotech #P04-80100).

Les MC3T3 sont des ostéoblastes de calvaria de souris spontanément immortalisées. Elles sont un don du Dr Marthe Rousseau (Laboratoire de Biologie des Tissus Ostéo-articulaires). Les cellules ont été cultivées dans du α -MEM (Sigma #M4526) supplémenté avec 10 % de SVF (PAN-Biotech #500105) et 2 mM de L-Glutamine (PAN-Biotech #P04-80100).

	HOB	BM-MSC	MC3T3	MG-63	Y201
Lignée/cellules primaires	Primaires	Primaires	Lignée	Lignée	Lignée
Origine	Os trabéculaire humain	Moelle osseuse humaine	Calvaria de souris (immortalisation spontanée)	Ostéosarcome humain	Moelle osseuse humaine
Milieu de prolifération	DMEM glucose 1 g/L + 10 % SVF + 2 mM L-glutamine + 50 µg/mL acide ascorbique	MSC Growth	α-MEM + 10 % SVF + 2 mM L-glutamine	DMEM glucose 1 g/L + 10 % SVF + 2 mM L-glutamine	DMEM glucose 4,5 g/L + 10 % SVF + 2 mM GlutaMax
Densité de semencement (cellules/cm ²)	6000 – 10000	5000	6000	4000	15 000

TABLE 2.1 – Cellules utilisées pour les modèles de tissus osseux. HOB : ostéoblastes primaires humains. Le temps de doublement et la densité à confluence varient fortement d'un donneur à l'autre. BM-MSC : cellules stromales mésenchymateuses de moelle osseuse. Leur milieu de culture est un milieu propriétaire commercialisé par PromoCell.

Les Y201 sont des cellules stromales mésenchymateuses de moelle osseuse immortalisées par la méthode hTERT [236]. Elles nous ont été transmises par le Pr Paul Genever (University of York). Elles ont été cultivées dans du DMEM GlutaMAX à 4,5 g/L de glucose (Gibco™ #31966021), supplémenté avec 10 % de SVF (Gibco™ #A3160802).

2.1.2 Modèles de derme

Les modèles de derme ont été établis à partir de deux sources de cellules : des fibroblastes primaires humains et une lignée de fibroblastes immortalisés. Leurs conditions de culture sont récapitulées dans le tableau 2.2.

	Fibroblastes	BJ-5ta
Lignée/cellules primaires	Primaires	Lignée
Origine	Prépuce	Prépuce
Milieu de prolifération	DMEM glucose 4,5 g/L + 10 % SVF + 2 mM GlutaMAX	1/5 M199 +4/5 DMEM +10 % SVF+4 mM GlutaMAX
Densité ensemencement (cellules/cm ²)	6000	6000

TABLE 2.2 – Cellules utilisées pour les modèles de derme.

Les fibroblastes primaires humains de prépuce ont été donnés par LabSkin Creations et ont été cultivés dans du DMEM GlutaMAX à 4,5 g/L de glucose (Gibco™ #31966021), supplémenté avec 10 % de SVF (Gibco™ #A3160802).

Les BJ-5ta (ATCC CRL-4001) sont des fibroblastes humains de prépuce immortalisés par la méthode hTERT. Elles ont été cultivées dans un mélange contenant 4 volumes de DMEM GlutaMAX à 4,5 g/L de glucose (Gibco™ #31966021) et 1 volume de M199 (PAN-Biotech #P04-07500) supplémenté avec 2 mM de GlutaMax (total 4 mM) et 10 % de SVF (Gibco™ #A3160802) et 0,01 mg/mL d'hygromycine B.

Les différentes lignées cellulaires ont été mises en culture en flasques statiques, en incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂.

L'amplification et la maintenance cellulaire ont été réalisées par trypsination. Lorsque les cellules ont eu atteint 90 % de confluence, elles ont été rincées au PBS sans calcium et sans magnésium (Gibco #14190169) puis détachées par incubation avec de la trypsine-EDTA 0,05 % pendant 3 minutes à 37 °C. Elles ont été centrifugées à 290 g pendant 5 minutes puis comptées et réensemencées aux densités indiquées dans les tableaux 2.1 et 2.2 pour prolifération ou utilisées pour les différentes expériences.

2.1.3 Induction et observation des ostéoblastes en ostéocytes

La différenciation des ostéoblastes a été réalisée en 2D après 21 à 30 jours de culture. Il s'agit de mettre en place les conditions favorisant la sécrétion d'une matrice minéralisée, caractéristique des ostéoblastes matures. Cette différenciation a été induite par ajout de facteurs de différenciation dans le milieu de prolifération. Le milieu de différenciation est composé du milieu de base (DMEM pour les ostéoblastes primaires, les MG63 et les Y201 et α -MEM pour les MC3T3), complété avec 10 % de SVF, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'acide ascorbique, 5 mM de β -glycerophosphate et 0,1 μM de dexaméthasone.

Les cellules ont étéensemencées à 20 000 cellules/ cm^2 (densité proche de la confluence) dans des plaques 24 puits avec un coating de collagène I pour limiter le détachement cellulaire au cours de la différenciation. Après 48h, le milieu est remplacé par du milieu de différenciation.

L'observation de la sécrétion de matrice minéralisée a été réalisée après 21 à 30 jours selon les expériences. Les cellules ont été rincées au PBS puis couvertes de PFA pendant 15 minutes à température ambiante. Après un rinçage à l'eau distillée, la minéralisation a été évaluée par une coloration au rouge alizarine.

La solution de colorant a été préparée le jour même en dissolvant 0,4 g de rouge alizarine dans 20ml d'eau distillée et en ajustant le pH à 4,2 par ajout d'hydroxyde d'ammonium. Les puits ont été couverts de solution et incubés à température ambiante pendant 15 minutes sous agitation douce à l'abri de la lumière. Après 5 rinçages à l'eau distillée, les cellules ont été couvertes d'eau distillée pour empêcher la déshydratation et ont été observées au microscope optique. Les nodules de minéralisation sont visibles par marquage des ions calcium en rouge.

Le lot de SVF ayant un impact sur la capacité des ostéoblastes primaires à produire une matrice minéralisée, la différenciation a été réalisée avec 6 lots de SVF différents. Les résultats du marquage ont été comparés pour sélectionner le lot de SVF donnant le marquage le plus abondant et homogène. Le même lot de SVF a ensuite été utilisé pour toutes les expériences avec les ostéoblastes primaires, les BM-MSc, les MG-63 et les MC3T3.

2.2 Bio-fabrication par moulage ou bio-impression

2.2.1 Préparation de la bio-encre

La composition de la bio-encre est basée sur une formulation brevetée et publiée précédemment [164, 237]. Dans ces travaux, nous avons utilisé une formulation adaptée du laboratoire d'accueil qui comprend des variations dans la proportion des composants pour la rendre imprimable à 21 °C. La bio-encre est ainsi composée de trois solutions

préparées dans du milieu DMEM sans calcium (Gibco™ #21068208) avec 1 % de pénicilline/streptomycine (Gibco™ #15140122) et 1 µg/mL d'amphotéricine B (Gibco™ 15290026) : 20 % (m/v) de gélatine bovine (sigma #G1890), 4 % (m/v) d'alginate à faible viscosité (Alpha Aesar #A18565) et 8 % (m/v) de fibrinogène (Sigma #F8630). Les solutions sont placées une nuit à l'incubateur (37 °C, 5 % de CO₂) pour dissolution complète des composants.

Le jour du moulage ou de la bio-impression, la préparation de la bio-encre débute par la trypsination des cellules amplifiées en 2D (section 2.1). Les cellules en suspension ont alors été comptées pour déterminer la quantité de cellules disponibles pour préparer la bio-encre. Le culot cellulaire est ensuite repris dans le volume de fibrinogène nécessaire pour obtenir une formulation finale à 2 % (m/v). L'alginate et la gélatine ont ensuite été ajoutés pour obtenir une solution finale à 5 % (m/v) de gélatine et 2 % (m/v) d'alginate. La bio-encre a ensuite été homogénéisée par une succession d'aspirations refoulements à la pipette visqueuse, puis placée à l'incubateur 10 minutes.

2.2.2 Moulage

La bio-encre a été déposée dans une plaque 24 puits (Corning #351147) à raison de 400 µL par puits. Les dépôts ont été incubés 20 minutes à température ambiante pour obtenir une solidification des structures moulées.

La solution de réticulation (décrite dans la section 2.2.4) a été ajoutée par-dessus. La plaque a été placée à l'incubateur pendant 30 minutes. Les bords des construits ont ensuite été détachés délicatement du puits en glissant un cône de micropipette de 10 µL pour permettre à la solution de réticulation de passer dessous et assurer ainsi une réticulation homogène. La plaque a été replacée à l'incubateur pendant 30 minutes. À la fin de l'étape de réticulation, les construits ont été transférés dans une plaque de culture 6 puits, rincés au NaCl et maturés en présence de 3 mL milieu de culture.

2.2.3 Bio-impression

La bio-encre homogénéisée a été versée dans une cartouche stérile de 10 mL (Nordson EFD), fermée d'un côté par un bouchon et de l'autre par un piston. La cartouche a été laissée 20 minutes à température ambiante.

La géométrie des objets à imprimer, ainsi que le nombre et l'épaisseur des couches et la vitesse de déplacement de la cartouche ont été définies grâce au logiciel TSIM. Le tranchage a également été effectué par ce logiciel. Dans notre cas, les objets à imprimer étaient composés de 5 couches de 0,4mm d'épaisseur. Les géométries étaient soit des carrés de 1 cm de côté, soit des disques de 1 cm de diamètre. L'impression a été réalisée à l'aide du BioAssemblyBot 400 (Advanced Solutions). La cartouche était équipée d'une aiguille de 0,4 mm de diamètre et 6 mm de long.

2.2.4 Réticulation

Après impression, les construits ont été délicatement décollés de leur support et transférés dans des plaques de culture 12 puits pour l'étape de réticulation, essentielle pour consolider les objets et permettre leur maturation à 37°C. L'alginate a été réticulé par l'apport d'ions Ca^{2+} , soit par une solution 3 % de CaCl_2 (Sigma #C5670) dans de l'eau distillée, soit par du DMEM avec calcium (0,02 %). Pour réticuler la gélatine et empêcher sa liquéfaction à 37°C, de la transglutaminase (Ajinomoto ActivaWM) a été ajoutée en concentration variable de 0,2 % (m/v) à 4 % (m/v). Les solutions sont été filtrées sur filtre à 0,2 μm . Une solution de thrombine (Sigma #T4648-10KU) préparée dans de l'eau distillée stérile a été ajoutée à une concentration finale de 20 U/mL. Les construits ont été couverts de la solution complète et placés à l'incubateur pendant 60 minutes. Les construits sont ensuite rincés 3 fois avec du NaCl stérile (Versol), couverts avec 1,5 mL de milieu de culture correspondant aux cellules supplémenté avec 1 % de pénicilline/streptomycine et 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'amphotéricine B (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les modèles de tissu osseux) puis replacés à l'incubateur.

2.2.5 Maturation des construits

Le milieu a été renouvelé le lendemain de l'impression pour éliminer les éventuelles traces de gélatine et d'alginate non réticulés relargués dans le milieu. Pour les fibroblastes primaires et les BJ-5ta, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'acide ascorbique a été ajouté à chaque changement de milieu. Pour les ostéoblastes primaires humains, les MC3T3 et les Y201, le milieu de prolifération a été remplacé par du milieu de différenciation après 2 jours. Les milieux ont été renouvelés deux fois par semaine.

Cellules	Densité d'ensemencement	Milieu de culture
HOB	3.10^5 cellules/mL	DMEM glucose 1 g/L + 10 % SVF + 2 mM L-Glutamine + 50 µg/mL acide ascorbique + 5mM β -glycerophosphat + 0,1 µM de dexamethasone + 1% penicilline/streptomycine + 0,3 µg/mL amphotéricine B
MC3T3	1.10^6 cellules/mL	α -MEM + 10 % SVF + 2 mM L-glutamine + 50 µg/mL acide ascorbique + 5mM β -glycerophosphate + 0,1 µM dexamethasone + 1% penicilline/streptomycine + 0,3 µg/mL amphotéricine B
Y201	3.10^5 cellules/mL	DMEM glucose 4,5 g/L + 10 % SVF + 2 mM L-Glutamine + 50 µg/mL acide ascorbique + 5mM β -glycerophosphat + 0,01 µM de dexamethasone + 1% penicilline/streptomycine + 0,3 µg/mL amphotéricine B
Fibroblastes	3.10^5 cellules/mL	DMEM glucose 4,5 g/L + 10 % SVF + 2 mM GlutaMAX + 1% penicilline/streptomycine + 1 µg/mL amphotéricine B
BJ-5ta	3.10^5 cellules/mL	1/5 M199 +4/5 DMEM +10 % SVF+4 mM GlutaMAX+ 1% penicilline/streptomycine + 1 µg/mL amphotéricine B

TABLE 2.3 – Conditions de culture des construits moulés ou bio-imprimés

2.3 Suivi des cultures 3D

2.3.1 Contraction des construits par analyse macroscopique

La contraction des construits a été monitorée par l'analyse d'images macroscopiques obtenues par photographie. Les construits cellularisés et les contrôles respectifs ont été pris en photos dans leur puits de culture. Le logiciel d'analyse d'images ImageJ a ensuite été utilisé pour déterminer la surface du construit (en pixels²). La surface des puits de culture étant standardisée, nous avons pu convertir la surface du construit (mesurée en pixels²) en cm². Un minimum de trois construits pour chaque condition ont été mesurés. La contraction (exprimé en %) pour chaque jour (J_i) a été calculée de la manière suivante :

$$\text{contraction} = \frac{\text{surface}_{J_1} - \text{surface}_{J_i}}{\text{surface}_{J_1}} \times 100$$

Où surface_{J_1} et surface_{J_i} désignent respectivement la surface au premier et au i -ème jour de culture.

La contraction des construits acellulaires a été soustraite à celle des construits cellularisés pour évaluer la contraction générée par les cellules.

2.3.2 Viabilité et prolifération

2.3.2.1 Marquage par calcéine AM

La viabilité et la répartition des cellules dans les construits ont été évaluées par calcéine AM (Invitrogen #C1430). Les construits ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C avec 0,5 mL de calcéine à 2 μ M préparée dans du PBS. Ils ont ensuite été rincés avec 2 mL PBS. La calcéine non fluorescente qui a pénétré dans le cytoplasme des cellules vivantes est convertie en calcéine fluorescente par des enzymes intracellulaires. Ainsi, nous avons pu acquérir des images des cellules vivantes avec un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse Ts2R équipé avec un filtre à 475 nm).

2.3.2.2 Dissociation et numération des cellules

Afin d'évaluer la prolifération cellulaire au sein des construits, les cellules ont été dénombrées à différent temps de culture pour établir une courbe de croissance. Pour ce faire, les construits ont été dissociés et les cellules comptées sur hémocytomètre pour déterminer le nombre de cellules par construit. Après un rinçage au PBS, les construits ont été soumis à une digestion enzymatique dans 1 mL de trypsine 0,05 % à 37°C avec agitation manuelle au bout de 5 minutes. Après arrêt de l'action de la trypsine par ajout de 1 mL de milieu supplémenté avec du SVF, les construits ont été centrifugés et rincés avec 2 mL de PBS. L'incubation avec 0,5 mL de collagénase à 30 mg/mL dans du PBS a

ensuite permis de dissoudre les construits et de libérer les cellules. Cette étape a eu lieu à 37 °C avec agitation manuelle toutes les 5 minutes pendant 10 à 30 minutes selon les conditions de réticulation des construits. Après centrifugation, les cellules ont été reprises dans du PBS et comptées.

2.3.3 Métabolisme du lactate

Le lactate est un indicateur de l'activité métabolique des cellules vivantes. Nous avons effectué le dosage du lactate sur des prélèvements de surnageant de culture réalisés lors du renouvellement des milieux de culture des construits. Le milieu de culture supplémenté a été utilisé comme référence.

Le dosage enzymatique du lactate fait intervenir deux enzymes. Dans un premier temps, la lactate déshydrogénase convertit le lactate en pyruvate et NADH en présence de NAD⁺. Ensuite, pour éviter que la réaction inverse ne se produise, le pyruvate est converti en D-alanine et 2-oxoglutarate par la D-glutamate-pyruvate transaminase (D-GPT). La quantité de NADH produite lors de la première étape est proportionnelle à la concentration de lactate. Ce composé est évalué par mesure d'absorbance (figure 2.1).

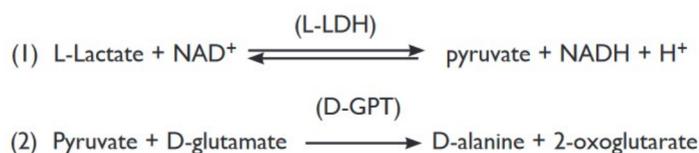


FIGURE 2.1 – Fonctionnement réactionnel du dosage du lactate

Le dosage a été effectué grâce à un kit spécifique (L-Lactic Acid AssayKit, Megazyme), selon les instructions du fabricant pour la réalisation du dosage à l'aide d'un automate. Deux solutions de réactifs ont été préparées : la première (R1) contenait le tampon, la NAD⁺ et la D-GPT et la deuxième (R2) contenait la L-LDH. Les échantillons de surnageants ont été déposés dans une plaque 96 puits à raison de 100 µL par puits. Certains échantillons trop concentrés en lactate ont été préalablement dilués dans de l'eau distillée. L'automate (Tecan Freedom EVO) dépose 200 µL de solution R1, 10 µL de surnageant et 25 µL de solution R2 dans les puits d'une plaque 96 puits à fond plat (Greiner bio-one). Après 10 minutes d'incubation dans le noir à 25 °C, l'absorbance à 340 nm est mesurée par un lecteur de plaque Infinite 200 PRO (Tecan). Une solution standard d'acide lactique à 0,15 mg/mL sert d'étalon pour la conversion de l'absorbance en concentration d'acide lactique. Le bruit de fond a été corrigé en soustrayant l'absorbance du milieu de culture sans SVF. Pour calculer la concentration d'acide lactique produite par les cellules, la concentration mesurée dans les surnageants a été normalisée par la concentration obtenue dans le milieu de référence supplémenté. En effet, le SVF ajouté dans les milieux de culture contient de l'acide lactique dont la concentration dépend du lot utilisé.

2.3.4 Histologie

Les techniques d'histologie regroupent toutes les étapes de préparation nécessaires à l'observation microscopiques des tissus (figure 2.2). Ces étapes sont nécessaires à la préservation de l'intégrité anatomique des tissus et à la révélation des structures d'intérêt.

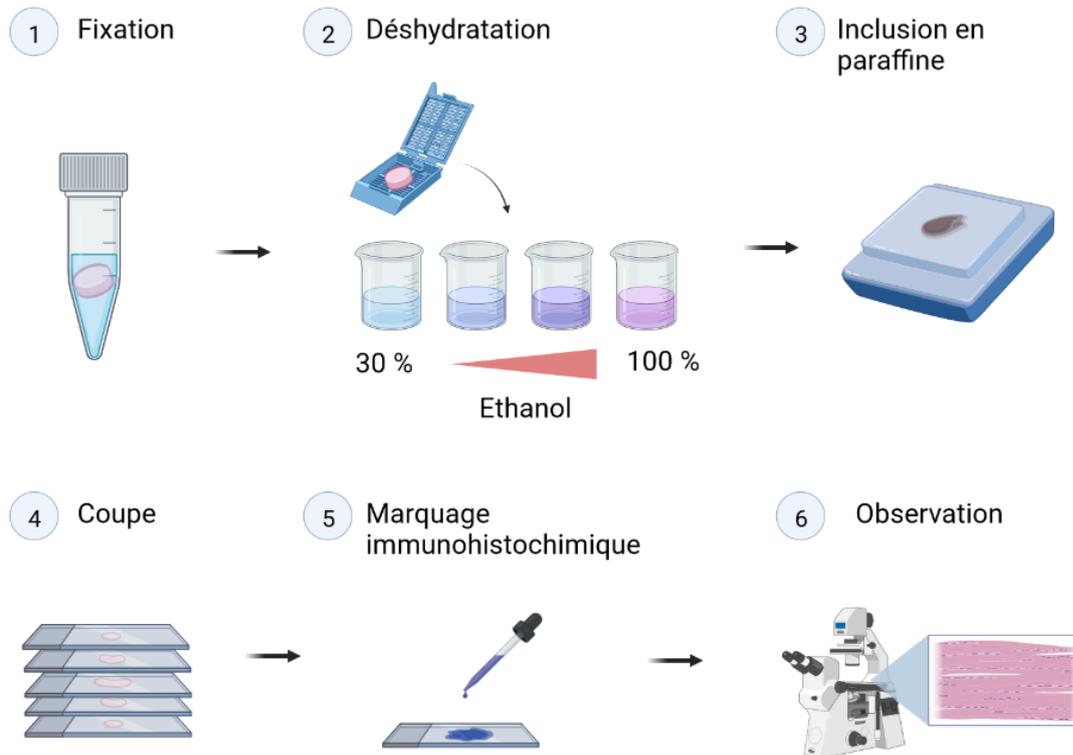


FIGURE 2.2 – Préparation des échantillons pour les analyses histologiques. Figure réalisée avec Biorender.

2.3.4.1 Fixation et inclusion en paraffine

La fixation sert à fixer chimiquement les constituants des cellules et des tissus de manière à préserver leur structure. Cette étape a été réalisée grâce à une solution de 4 % de paraformaldéhyde prête à l'emploi (Antigenfix, Microm Microtech). Les construits ont été immergés dans cette solution sur la nuit à 4 °C. Ils ont ensuite été rincés à l'eau distillée, déshydratés dans des bains croissants d'éthanol puis inclus en paraffine. Les blocs obtenus ont été coupés en section de 5µm d'épaisseur.

2.3.4.2 Marquage de protéines spécifiques par immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode de détection des protéines dans les cellules présentes sur une coupe de tissu grâce à la détection d'antigènes spécifiques par des anticorps. L'interaction entre l'antigène et l'anticorps est visualisée soit par la production

d'un composé coloré à la suite d'une réaction enzymatique, soit par utilisation d'un marqueur fluorescent (figure 2.3).

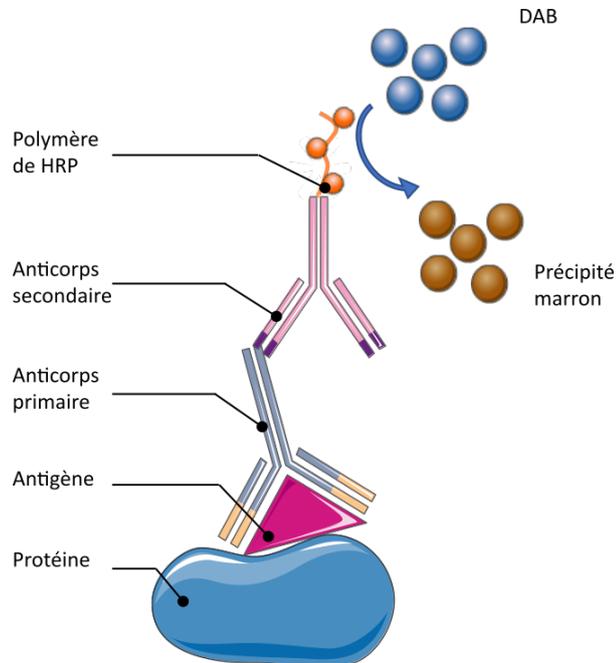


FIGURE 2.3 – Principe de marquage par immunohistochimie. L'anticorps primaire se fixe à l'antigène. Un anticorps secondaire couplé à la horse raddish peroxydase (HRP) se lie à l'anticorps primaire. Le substrat est converti en composé coloré marron.

Les sections ont été déparaffinées et réhydratées dans des bains d'éthanol décroissants. La fixation au paraformaldéhyde provoque une réticulation des protéines qui masquent les sites antigéniques reconnus par les anticorps. Il faut donc démasquer ces sites par une méthode spécifique à chaque protéine d'intérêt (tableau 2.4). Les étapes suivantes ont été réalisées avec le kit ImmPRESS Excel Amplified Polymer Kit (Vector laboratories #MP-7602) d'après les instructions du fournisseur. Les peroxydases endogènes ont été bloquées par incubation avec le BLOXALL pendant 10 minutes et les sites de fixation non spécifiques ont été bloqués par incubation avec la solution BlockAid (ThermoFisher, #B10710) pendant 30 minutes. L'anticorps primaire a été incubé sur la nuit à 4 °C en chambre humide. Après un rinçage au PBS, une étape d'amplification pour augmenter l'intensité du signal a eu lieu, suivie par l'incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la horse raddish peroxydase (HRP) pendant 30 minutes. La révélation a été réalisée avec le substrat ImmPACT DAB qui produit une coloration marron. Les noyaux des cellules ont été visualisés par un contre marquage bleu à l'hématoxyline de Gill. Pour chaque marquage, un témoin négatif a été réalisé en omettant l'étape d'incubation avec l'anticorps primaire. La liste des anticorps utilisés avec leur concentration est résumée dans le tableau 2.4.

Protéine cible	Localisation	Anticorps primaire	préparation	Dilution	Démasquage
Fibres d' α -SMA	Cytosquelette	anti α -SMA (Sigma #A2547)		1/800	Tampon citrate : 20 min à 100°C
Collagène I	Matrice extracellulaire	anti Collagène I (Novotec, #20111)		1/2000	Hyaluronidase : 30 min en chambre humide à 37°C, PBS : 3 x 5 min, Pepsine : 15 min en chambre humide à 37°C
PHEX	Membranes cellulaires	anti PHEX (Boster #A02078)		1/200	Tampon citrate : 20 min à 100°C
Fibronectine	Matrice extracellulaire	anti fibronectine (Novotec #24911)		1/2000	Trypsine : 17 min en chambre humide à 37°C

TABLE 2.4 – Anticorps utilisés et protocole de démasquage

2.3.4.3 Marquage du cytosquelette

La morphologie des cellules dans les construits a été observée grâce au marquage du cytosquelette d'actine à la phalloïdine couplée à un marqueur fluorescent rouge (Alexa Fluor 546 Invitrogen #A22283). Le marquage a été réalisé soit sur des coupes déparaffinées, soit sur l'hydrogel fixé au paraformaldéhyde (section 2.3.4.1).

Pour les études avec les fibroblastes, le marquage a été réalisé sur des sections de 5 μm après déparaffinage et réhydratation dans des bains décroissants d'éthanol. Les échantillons ont été perméabilisés à l'acétone pendant 3 minutes à -20°C et rincés deux fois à l'eau distillée. Les coupes ont ensuite été incubées 45 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière avec la phalloïdine à 5 U/mL. Les noyaux ont été contremarqués avec du DAPI (Invitrogen #D3571) à 300 nM pendant 5 minutes. Les images ont été acquises via un scanner de lame Axio Scan.Z1 (Zeiss) équipé d'un objectif 20X et de filtres à 405 et 561 nm.

Pour les études avec les ostéoblastes, le marquage a été réalisé sur le gel entier après fixation. Les construits ont été perméabilisés au TritonX-100 0,1 % pendant 15 minutes, rincés au PBS et incubés avec la phalloïdine à 5 U/mL pendant 90 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les noyaux ont été contremarqués au DAPI à 300 nM pendant 5 minutes. Les images ont été acquises au microscope confocal Zeiss LSM 880 équipé d'un objectif à 20X et de filtres à 405 et 561 nm. Les projections d'intensité maximale des stacks obtenus ont été générées avec le logiciel Zen blue.

2.3.5 Microscopie électronique à transmission

La microstructure des construits ainsi que le contenu des cellules ont été observés par microscopie électronique à transmission au Centre d’Imagerie Quantitative de Lyon Est (CIQLE). Les échantillons ont été fixés par incubation dans du glutaraldéhyde 2 % pendant 2 heures à 4°C. Après 3 rinçages, une deuxième étape de fixation avec 2 % de tétroxyde d’osmium pendant 1 heure à 4 °C a eu lieu. Les échantillons ont ensuite été déshydratés par des bains croissants d’éthanol et incorporés dans une résine époxy par polymérisation pendant 72 heures à 60 °C. Des sections de 70 nm ont été réalisées avec un ultra microtome UC7 (Leica), montées sur des grilles de cuivre et contrastées avec de l’acétate d’uranyle et de l’acétate de plomb. Pour les analyses par spectroscopie de rayons X à dispersion d’énergie, les grilles ont été carbonées. L’acquisition des images a été réalisée par un microscope à transmission électronique 1400JEM (Jeol).

La porosité des construits a été évaluée via ImageJ. Les images ont été converties en images 8 bit (échelle d’intensité de gris de 0 à 255). Le seuil a été déterminée sur chaque image pour sélectionner l’espace vide entre les fibres puis les images ont été binarisées (figure 2.4). Le pourcentage de surface (correspondant au pourcentage de porosité) a été mesuré. Au moins 5 images prises dans des zones différentes ont été analysées pour chaque échantillon.

Le degré d’alignement des fibres qui composent les construits a également été évalué via ImageJ. Le Plugin FibrilTool a été utilisé pour calculer le degré d’alignement des fibres [238].

Pour confirmer la présence de nodules de minéralisation dans les construits, une analyse par spectroscopie de rayons X à dispersion d’énergie a été effectuée. L’interaction du faisceau d’électrons (source d’excitation de la microscopie électronique à transmission) génère plusieurs signaux, parmi lesquels des rayons X (figure 2.5). L’énergie des rayons X émis par l’échantillon est caractéristique des éléments atomiques qui interagissent avec le faisceau d’électrons. Le spectre obtenu permet ainsi de renseigner sur la composition de l’échantillon.

2.3.6 Dosage de la phosphatase alcaline

Les cellules pouvant se différencier dans la lignée ostéoblastique (ostéoblastes et cellules souches mésenchymateuses) sécrètent de la phosphatase alcaline (ALP) responsable de la minéralisation de la matrice. Le dosage de l’ALP est réalisé grâce à une analyse biochimique. En effet, l’ALP catalyse l’hydrolyse des phosphates en pH basique. La quantité d’ALP présente peut être déterminée par l’addition de p-nitrophenyl phosphate comme substrat de l’enzyme. En effet, l’ALP hydrolyse le substrat en phosphate et p-nitrophenol, de couleur jaune. L’intensité de la couleur est proportionnelle à l’activité de l’ALP et se mesure par absorbance à 405 nm (figure 2.6) [240].

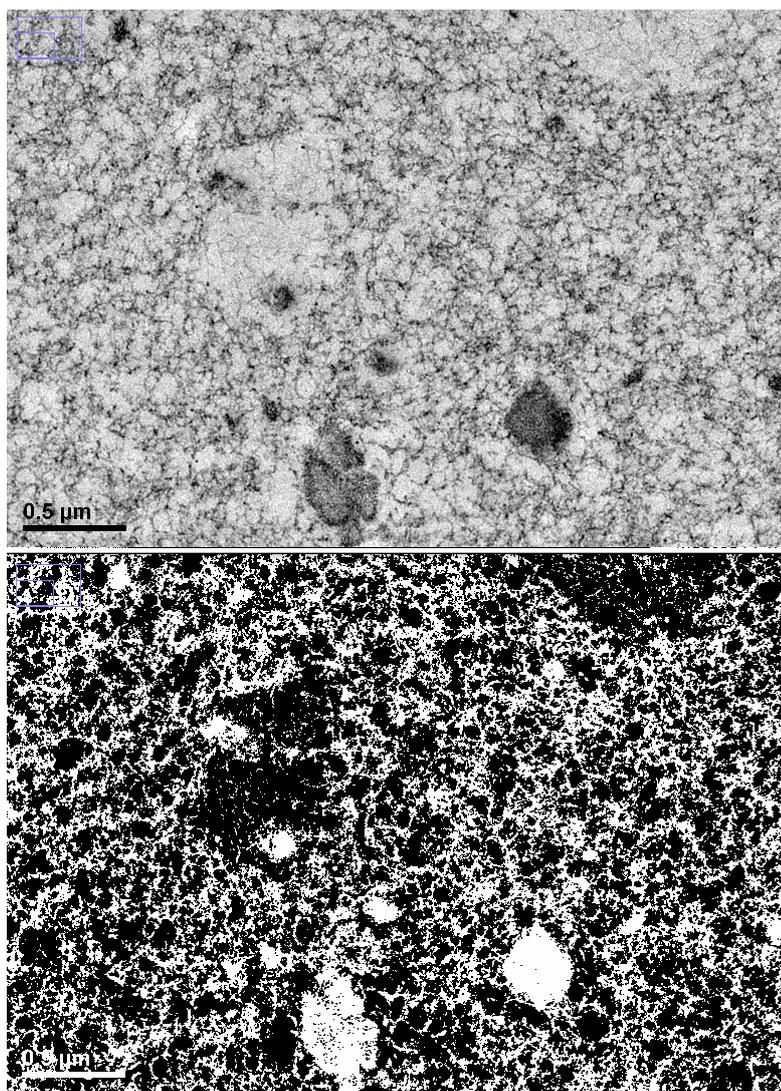


FIGURE 2.4 – Image en microscopie électronique à transmission avant (en haut) et après (en bas) application d'un seuil et binarisation. L'espace vide sélectionné entre les fibres apparaît en noir.

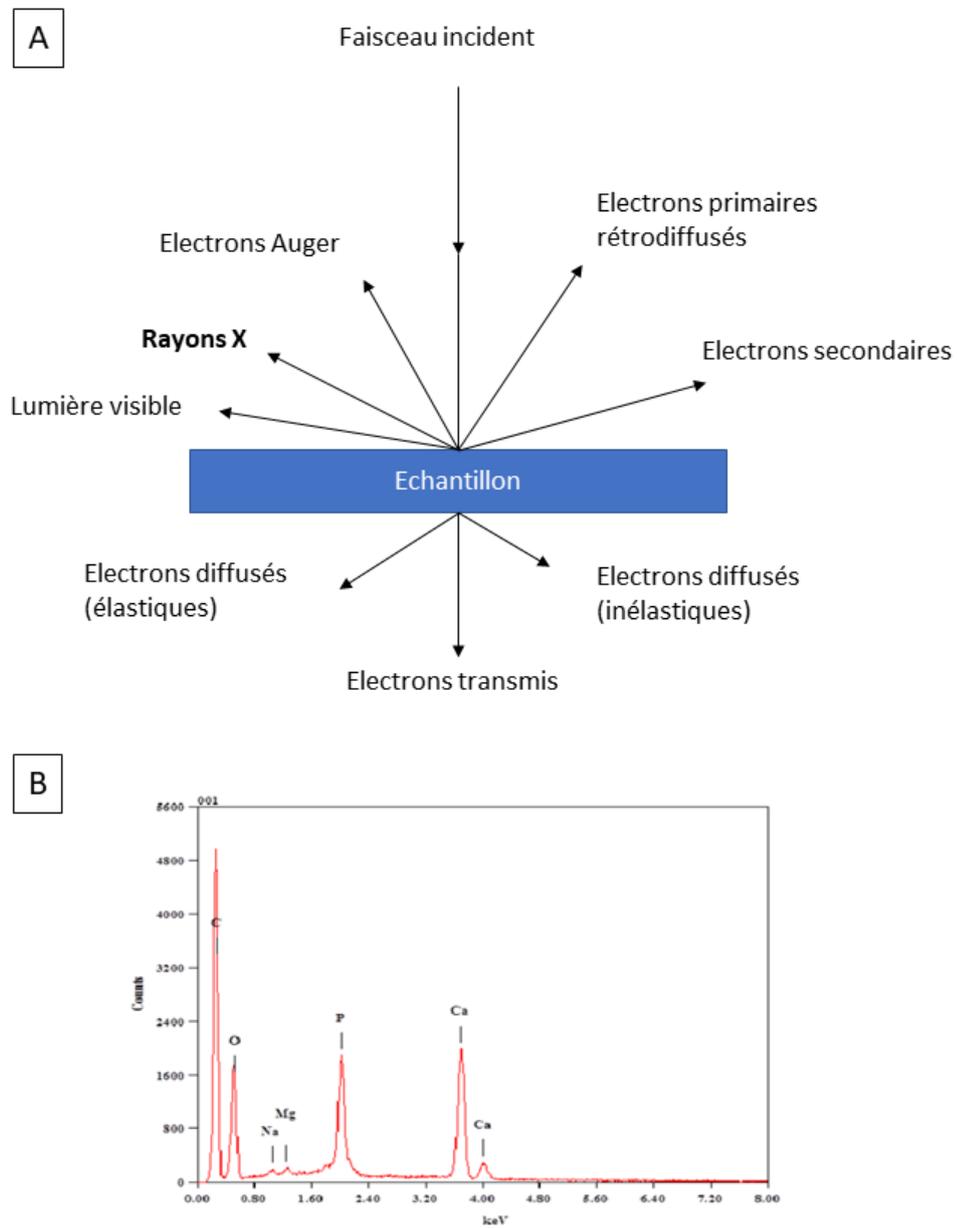


FIGURE 2.5 – Principe de fonctionnement de la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie. A : Interactions entre un faisceau d'électrons et un échantillon. B : Exemple de spectre obtenu sur de la poudre d'hydroxyapatite [239]. Les pics caractéristiques du calcium et du phosphore, principaux composant de l'hydroxyapatite, sont visibles à 3,7 et 2,0 keV respectivement.

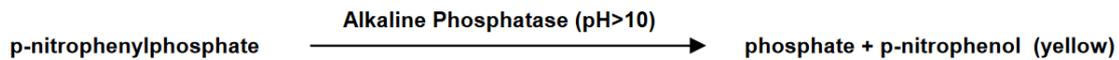


FIGURE 2.6 – Principe de fonctionnement réactionnel du dosage de l'ALP

L'activité de l'ALP a été évaluée sur les culots cellulaires conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ après dissociation enzymatique des construits (section 2.3.2.2). Après décongélation, les cellules ont été lysées dans $200\text{ }\mu\text{L}$ de tampon composé de $0,1\%$ de TritonX-100 dans du Tris-HCl à 10 mM pendant 60 minutes sur glace et sous agitation douce. La solution de substrat est obtenue en dissolvant 100 mg de substrat (4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, Sigma #N27625) dans une solution tampon de diéthanolamine 1 M (Roth #0332.1) et $0,5\text{ mM}$ de MgCl_2 (Fisher #10386743). Pour chaque échantillon, $50\text{ }\mu\text{L}$ de lysat cellulaire ont été incubés en présence de $250\text{ }\mu\text{L}$ d'alkaline buffer (Sigma #A9226), de $50\text{ }\mu\text{L}$ de solution de substrat et $100\text{ }\mu\text{L}$ d'eau distillée pendant 15 minutes à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La réaction a été arrêtée avec l'ajout de $500\text{ }\mu\text{L}$ de NaOH à $0,1\text{ M}$. L'absorbance a ensuite été mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque Infinite 200 PRO (Tecan). Une gamme étalon de p-Nitrophénol de 100 à $700\text{ }\mu\text{M}$ a été utilisée pour la conversion de l'absorbance en μM de p-nitrophenol. Les résultats ont été normalisés par le nombre de cellules restantes dans chaque culot cellulaire après la dissociation enzymatique.

2.3.7 Caractérisation mécanique

Les propriétés mécaniques des construits ont été évaluées à trois échelles différentes : macroscopique par analyse mécanique dynamique (DMA), mésoscopique par indentation et nanoscopique par AFM.

2.3.7.1 Analyse mécanique dynamique (DMA)

Le comportement viscoélastique des construits a été évalué par analyse mécanique dynamique (DMA). Cette méthode consiste à appliquer une contrainte (ou un déplacement) sinusoïdale sur le matériau et à mesurer le déplacement (ou la contrainte) correspondant. Si le matériau a un comportement purement élastique, alors la réponse sinusoïdale est en phase (c'est-à-dire superposée) au signal imposé. Si le matériau est parfaitement visqueux, un déphasage δ de $\pi/2$ sera observé à cause de la dissipation d'énergie imposé au matériau. Pour un matériau viscoélastique, un déphasage $0 < \delta < \pi/2$ va être introduit entre les deux courbes (figure 2.7). En comparant l'amplitude et le décalage de la réponse du matériau par rapport à la contrainte appliquée, le module de stockage et le module de perte peuvent être calculés en fonction de la fréquence de sollicitation.

Les essais de DMA ont été réalisés sur un rhéomètre DHR2 (TA instrument) équipé d'une géométrie cylindrique dentelée de 8 mm . Les essais ont été réalisés en compression à

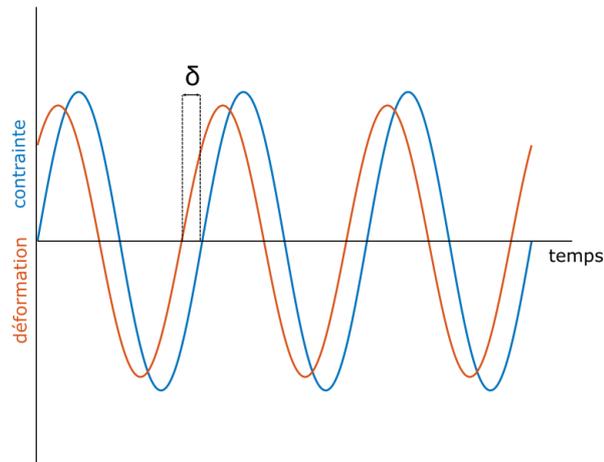


FIGURE 2.7 – Signaux de contraintes et de déformations durant une stimulation sinusoïdale

déplacement imposé. Le domaine linéaire des construits a été établi en faisant varier l’amplitude des oscillations à 1Hz. Une fois le domaine linéaire identifié, les essais dynamiques ont été réalisés à une fréquence de 0,015 Hz à 1,5 Hz.

Le comportement rhéologique général d’un matériau viscoélastique peut être représenté par un modèle de Maxwell : un ressort connecté en série avec un amortisseur. Quand une contrainte est appliquée sur le matériau, le ressort va répondre en se déformant immédiatement, mais l’amortisseur retarde la déformation du système, ce qui introduit un déphasage entre la contrainte et la déformation. Ce modèle peut être généralisé avec l’ajout d’un ressort en parallèle à plusieurs éléments de Maxwell pour modéliser un matériau viscoélastique présentant une élasticité permanente (figure 2.8).

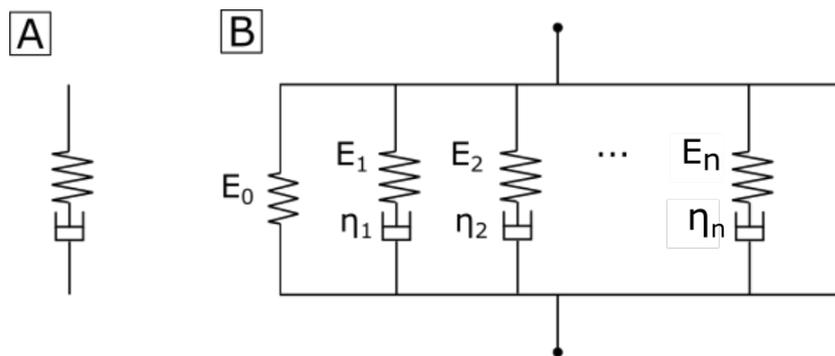


FIGURE 2.8 – Modèle de Maxwell (A) et Maxwell généralisé (B)

Les modules de stockage E' et de perte E'' sont définis par [241] :

$$E'(\omega) = E_0 \sum_{i=1}^n \left[1 + \frac{\beta_i \omega^2 \tau_i^2}{1 + \omega^2 \tau_i^2} \right] \quad (2.1)$$

$$E''(\omega) = E_0 \sum_{i=1}^n \frac{\beta_i \omega^2 \tau_i^2}{1 + \omega^2 \tau_i^2} \quad (2.2)$$

où E_0 est le module du ressort isolé et n est le nombre de branches du modèle. Le temps de relaxation τ_i et le paramètre adimensionnel β_i définissent la contribution de la i -ème branche au module global. Le nombre de branche est choisi de manière à assurer un ajustement (*fit*) précis de la courbe, tout en évitant d'obtenir des valeurs incohérentes pour les paramètres laissés libres (par exemple, des valeurs négatives pour β_i). Pour ces travaux, le nombre de branches est fixé à 2 et les valeurs des temps de relaxation sont fixés à $0,03 \text{ s}^{-1}$ et $0,3 \text{ s}^{-1}$ afin d'éviter un « problème mal posé » (*ill-posed problem*) dans la modélisation des courbes expérimentales. Les valeurs des paramètres sont obtenues en minimisant la fonction d'erreur :

$$f(E_0, \beta_1, \dots, \beta_n) = \sum_k \frac{(E'_k - E'_k{}^{mes})^2}{E'_k{}^{mes}} + \frac{(E''_k - E''_k{}^{mes})^2}{E''_k{}^{mes}} \quad (2.3)$$

où E'_k et E''_k sont les modules de stockage et de perte calculés et $E'_k{}^{mes}$ et $E''_k{}^{mes}$ sont les modules obtenus expérimentalement.

Une fois les paramètres viscoélastiques calculés, la viscosité globale η_0 est obtenue par :

$$\eta_0 = \sum_{i=1}^n E_0 \beta_i \tau_i \quad (2.4)$$

où n est le nombre de branches choisi pour le modèle.

2.3.7.2 Indentation

L'essai d'indentation consiste à enfoncer un indenteur rigide perpendiculairement à la surface d'un matériau, dont on souhaite évaluer ses caractéristiques mécaniques, et à mesurer la variation de la force normale appliquée, F_z , en fonction de l'enfoncement dans le matériau, δ . L'essai d'indentation permet de déterminer le module d'Young réduit, E^* , du matériau indenté, à partir de la mesure de la raideur normale de contact, K_z , définie comme la pente de la partie initiale de la courbe de déchargement (figure 2.9). Pour un matériau en contact avec un indenteur rigide axisymétrique, la raideur normale est liée au module d'Young réduit par [242] :

$$K_z = 2E^* a \quad (2.5)$$

où a est le rayon de contact indenteur/matériau.

Pour ce travail, les essais d'indentation ont été réalisés sur un dispositif développé au Laboratoire de tribologie Tribologie et Dynamique des Systèmes (LTDS) de l'Ecole

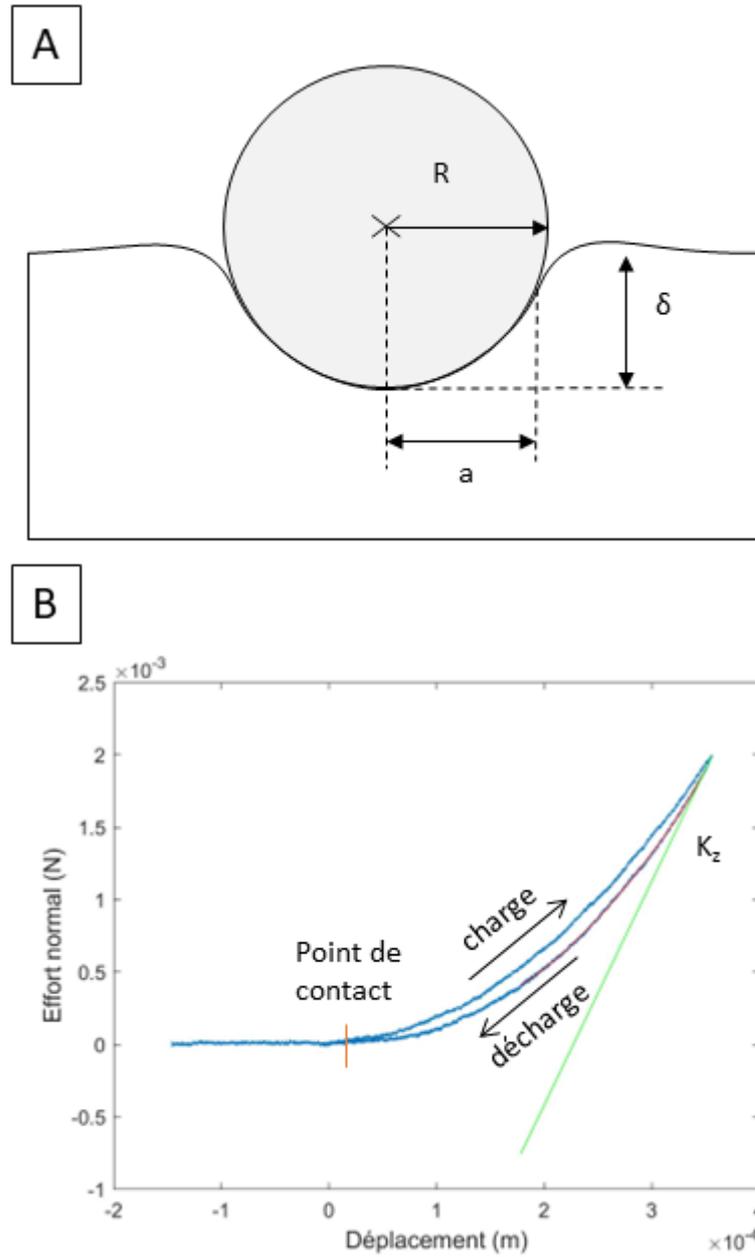


FIGURE 2.9 – Principe de fonctionnement d'un essai d'indentation avec un indenteur sphérique. A : Schéma du contact entre l'indenteur sphérique et l'échantillon. R : rayon de l'indenteur, δ : profondeur d'indentation, a : rayon de contact. B : exemple de courbe d'indentation. K_z : raideur normale de contact obtenue à partir de la partie initiale de la pente à la décharge (courbe verte).

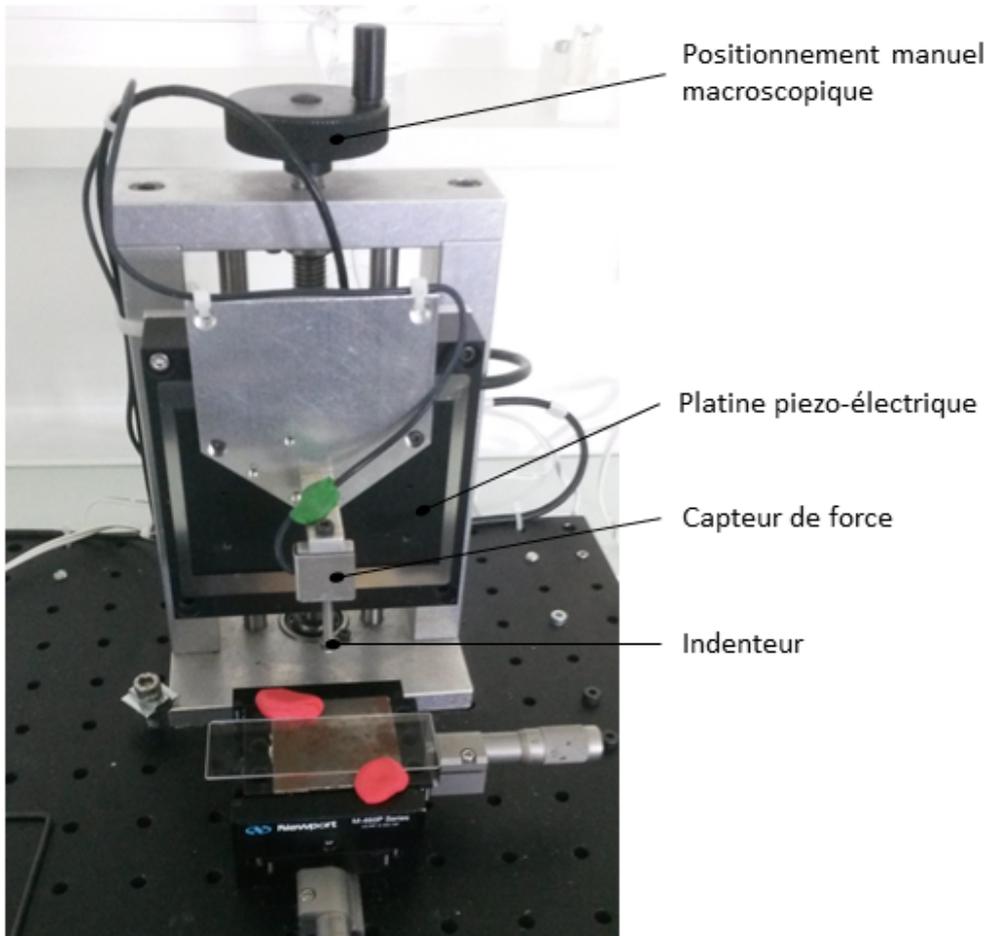


FIGURE 2.10 – Dispositif d'indentation utilisé pour la caractérisation mécanique.

Centrale de Lyon [169] dédié à la caractérisation des matériaux à faible module d'élasticité. Les essais ont été effectués à force imposée (1 mN pour les construits imprimés et 4 mN pour les construits moulés) et vitesse de déplacement constante égale à 25 $\mu\text{m/s}$. L'indenteur utilisé était un indenteur sphérique de rayon de courbure $R = 1,6 \text{ mm}$ (indenteur axisymétrique). Les mesures ont été répétées trois fois pour chaque échantillon et deux construits ont été évalués pour chaque condition.

2.3.7.3 Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique est une méthode qui permet de réaliser des courbes d'indentation à l'échelle nanométrique. Le système est composé d'une pointe attachée à un levier de raideur connue. Pour enregistrer une courbe force-déplacement, le déplacement du levier est piloté par un système piezo-électrique. Lorsque la pointe entre en contact avec l'échantillon, le levier va être dévié. Cette déviation est mesurée en évaluant les variations de trajet optique d'un laser réfléchi sur le bout du bras de levier (2.11). La

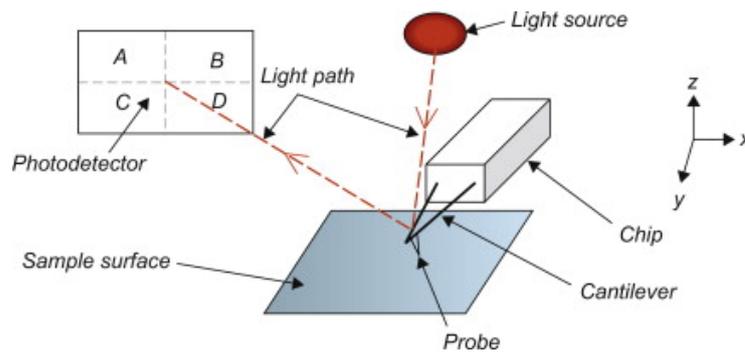


FIGURE 2.11 – Principe de fonctionnement de l'AFM. La pointe (probe) est montée à l'extrémité du levier (cantilever). La déviation du levier est évaluée par le changement de trajet optique d'un laser réfléchi par le levier [244].

déviation du levier en fonction du déplacement peut être convertie en courbe de force en fonction du déplacement par la relation suivante :

$$F = -k\Delta x \quad (2.6)$$

où F est la force, k la constante de raideur du levier et Δx la variation de déviation du levier [243].

Le module d'élasticité des construits acellulaires a été évalué par AFM après 1 nuit à l'incubateur. Les mesures ont été réalisées sur un AFM Park Instruments NX10 équipé de pointe CSC37 après calibration de la raideur de contact. Les mesures ont été réalisées en immersion dans du PBS pour s'affranchir des effets d'adhésion. Pour chaque échantillon, des grilles de 4x4 points de mesure ont été acquises. Le point de contact entre la pointe et l'échantillon a été déterminé manuellement par inspection visuelle des courbes. Le module d'élasticité a été calculé en réalisant un ajustement de la courbe d'approche par un modèle de Hertz pour un indenteur conique à l'aide du logiciel XEI.

2.4 Analyse des données

Les analyses ont été réalisées sur des faibles nombres d'échantillon (2 à 6 selon les expériences), ce qui n'a pas permis de réaliser des tests statistiques. Par conséquent les résultats présentés décrivent des tendances. Cela s'explique par le grand nombre de conditions testées, ce qui rendait impossible la production d'échantillons identiques en grand nombre.

Chapitre 3

Caractérisation mécanique multi-échelle des hydrogels acellulaires : effet des conditions de réticulation

Introduction

L'objectif de ce chapitre est de produire des matériaux aux propriétés mécaniques semblables à celles de la peau (5 à 30 kPa) [141] et de la matrice osseuse nouvellement déposée, l'ostéoïde (environ 20 à 30 kPa)[54]. L'obtention d'une gamme de propriétés mécaniques permettra d'étudier d'influence de ces propriétés sur le développement de modèles *in vitro* de derme et de tissu osseux.

Les hydrogels, moulés ou bio-imprimés, doivent subir une étape de réticulation pour empêcher qu'ils ne se solubilisent à nouveau une fois immergés dans du milieu de culture et placés en incubateur à 37°C. La réticulation des polymères formant les hydrogels crée des liaisons entre les molécules qui peuvent être réversibles (réticulations physiques) ou irréversibles (réticulations chimiques). Le type de liaisons impliqué dans la réticulation d'un hydrogel, ainsi que leur densité influencent le comportement mécanique du matériau obtenu. Il est donc possible d'obtenir des matériaux de composition identique mais avec des propriétés mécaniques différentes en changeant la densité des liaisons entre les molécules des polymères [245]. Pour augmenter la densité des liaisons, il est possible de jouer sur la concentration en solution du polymère, ou de son agent de réticulation. La réticulation des polymères constituant les hydrogels crée des liaisons entre les molécules qui peuvent être réversibles (réticulations physiques) ou irréversibles (réticulations chimiques). Dans notre cas, nous avons choisi de travailler à partir d'une formulation brevetée et déjà validée pour la bio-impression 3D de peau constituée de fibrinogène, d'alginate et de gélatine [164, 237].

La concentration de chaque composant est donc fixée car leurs concentrations garantissent les propriétés rhéologiques de l'encre nécessaires à la bio-impression de cette encre. La stratégie retenue pour créer une gamme de propriétés mécaniques est donc d'utiliser différentes concentrations d'agent de réticulation. Les deux principaux composants qui ont un impact sur les propriétés mécaniques du matériau sont l'alginate et la gélatine. L'alginate est réticulé grâce à l'ajout d'ions Ca^{2+} qui forment des liaisons métal-ligand réversibles [245] tandis que la gélatine est réticulée par une enzyme, la transglutaminase d'origine microbienne (E.C.2.3.2.13), qui crée des liaisons covalentes [246-248] (figure 3.1).

Les matériaux obtenus seront caractérisés mécaniquement à trois échelles : à l'échelle macroscopique par analyse mécanique dynamique, à l'échelle mésoscopique par micro-indentation et à l'échelle nanométrique par microscopie à force atomique. Cela permet d'obtenir la réponse globale des construits à une sollicitation, ainsi que d'accéder aux propriétés mécaniques de l'environnement immédiat des cellules. L'organisation des fibres formant le matériau sera observée par microscopie électronique à transmission (figure 3.1).

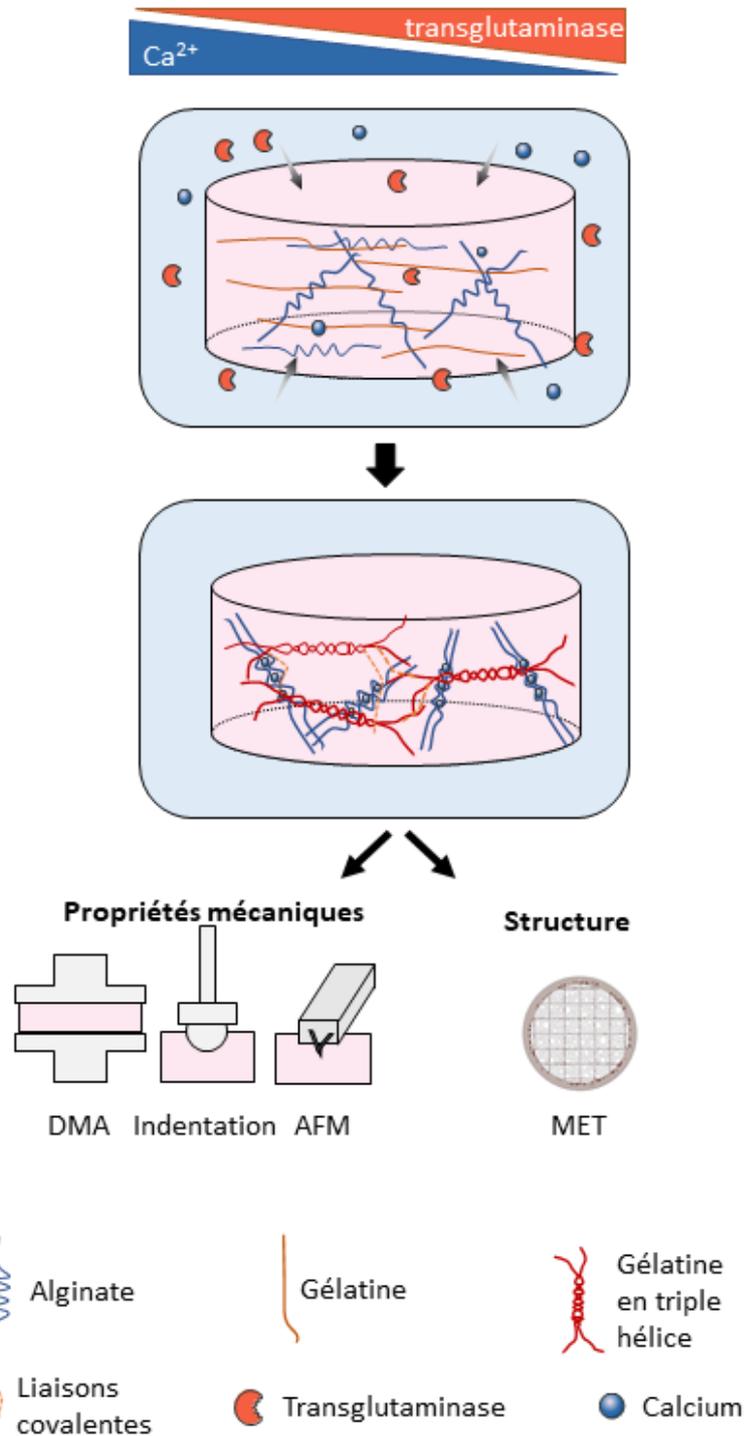


FIGURE 3.1 – Réticulation des construits bio-imprimés par immersion dans des solutions de CaCl_2 et de transglutaminase. Les agents de réticulation sont introduits en différentes concentrations. Ils se diffusent au sein du matériau pour établir des liaisons entre les différents polymères. Les propriétés mécaniques des matériaux obtenus sont caractérisées par analyse mécanique dynamique (DMA), micro-indentation et microscopie à force atomique (AFM). La structure des réseaux de fibres a été observée par microscopie électronique à transmission (MET).

3.1 Effet des conditions de réticulation sur l'aspect macroscopique des hydrogels

Nous avons choisi de travailler sur différentes gammes de solutions de réticulation, contenant des concentrations graduelles de transglutaminase et de chlorure de calcium, afin d'étudier leur effet sur les propriétés mécaniques des construits bio-imprimés. Ainsi nous avons criblé les solutions suivantes : de 0,04 % à 4 % de transglutaminase avec 3 % de CaCl_2 et 4 % de transglutaminase avec 0,02 % de CaCl_2 (apporté par le milieu de culture DMEM).

Nous avons sélectionné la concentration minimale de 0,2 % par rapport à la dégradabilité du biomatériau. En effet, les échantillons réticulés avec des concentrations en transglutaminase inférieures à 0,2 % se dégradent dès qu'ils étaient manipulés pour les essais mécaniques (figure 3.2-A). Les solutions de réticulation retenues sont donc celles qui assurent l'intégrité de l'échantillon lors des manipulations. Ainsi, trois compositions de solution de réticulation ont été retenues :

- 4 % de transglutaminase + 3 % de CaCl_2 , condition $\text{TG}_\text{H}\text{Ca}$;
- 0,2 % de transglutaminase + 3 % de CaCl_2 , condition $\text{TG}_\text{B}\text{Ca}$;
- 4 % de transglutaminase + DMEM (0,02 % de CaCl_2), condition $\text{TG}_\text{H}\text{DMEM}$;

Nous avons tout d'abord pu observer un impact significatif à l'échelle macroscopique sur la taille des échantillons réticulés. En effet, les construits bio-imprimés étant de taille identiques, nous avons suivi les différences de surface entre les construits après 1 jour d'incubation dans du milieu de culture (figure 3.2). Nous observons ici deux variations opposées par rapport aux dimensions des construits immédiatement après impression : d'une part à une augmentation de 38 % de la surface des construits $\text{TG}_\text{B}\text{Ca}$, et d'autre part par une diminution de 20 % de la surface des construits $\text{TG}_\text{H}\text{Ca}$ et $\text{TG}_\text{H}\text{DMEM}$. Cela signifie qu'il y a eu une contraction des construits $\text{TG}_\text{H}\text{Ca}$ et $\text{TG}_\text{H}\text{DMEM}$ alors que les construits $\text{TG}_\text{B}\text{Ca}$ ont subi une expansion après avoir été incubés pendant une nuit dans du milieu de culture.

Nous avons ensuite étudié l'impact de ces différences de comportement sur les propriétés mécaniques des bio-matériaux.

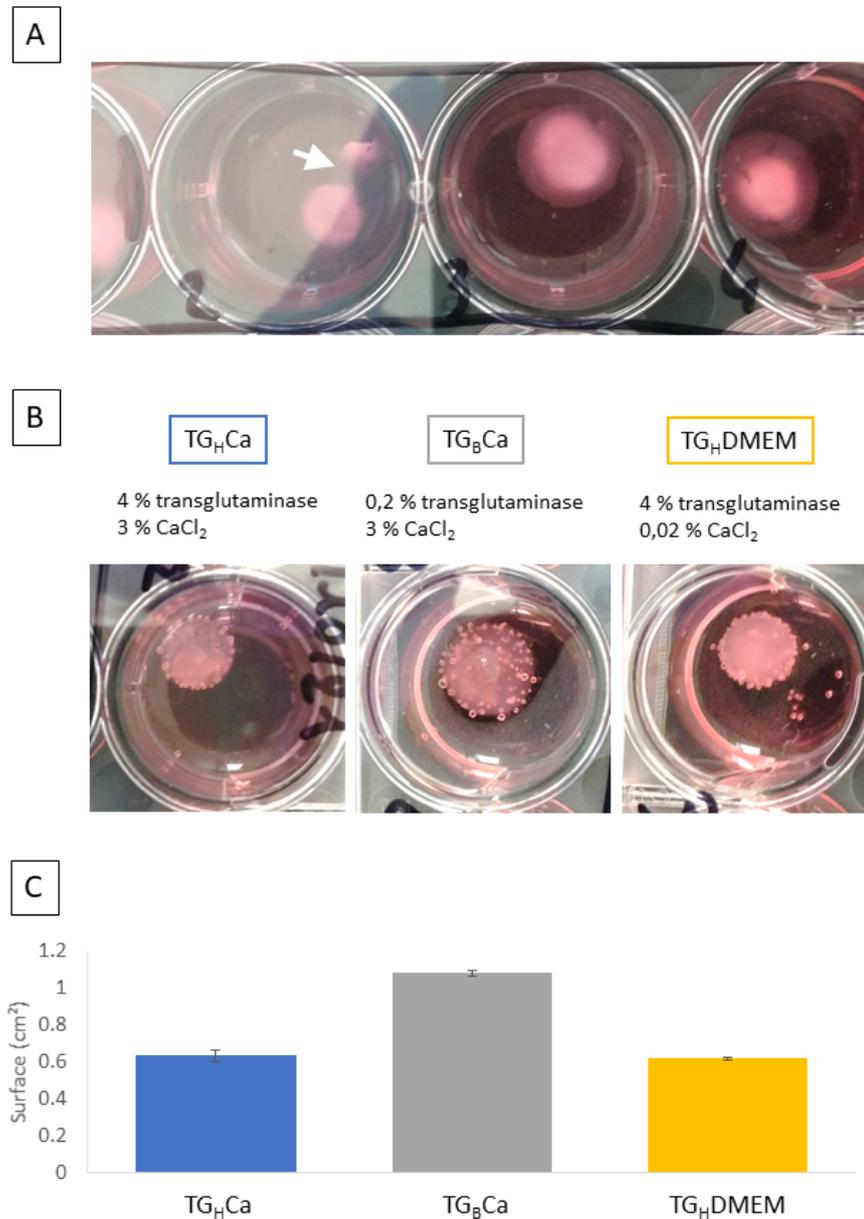


FIGURE 3.2 – Aspect macroscopique des hydrogels après avoir été replacé une nuit à l'incubateur après réticulation. A : La flèche blanche pointe sur un échantillon insuffisamment réticulé (condition de réticulation non retenue) qui s'est dégradé lors d'une manipulation. B : Différences de taille des échantillons polymérisés avec les différentes solutions après avoir passé une nuit à l'incubateur. C : Surfaces correspondantes des échantillons en cm². La structure est caractérisée par microscopie électronique à transmission (MET).

3.2 Effets des conditions de réticulation sur les propriétés mécaniques

3.2.1 Échelle macroscopique : analyse mécanique dynamique (DMA)

L'analyse des propriétés mécaniques de nos construits a été réalisée par DMA car cette méthode permet de caractériser le comportement viscoélastique à l'échelle macroscopique. Les résultats sont présentés en figure 3.3. Pour toutes les conditions, les valeurs de E' sont un ordre de grandeur supérieures à celle de E'' , ce qui traduit un comportement où la contribution visqueuse est faible devant la contribution élastique. La condition TG_HCa atteint la valeur de E_0 (déterminée à partir des équations 2.1 et 2.2, chapitre 2) la plus élevée avec $15,5 \pm 3,3$ kPa. Ce résultat était attendu car ce sont les construits qui ont été en contact avec les solutions de réticulation les plus concentrées en agent de réticulation. Les valeurs de E_0 sont similaires pour TG_BCa et TG_HDMEM avec respectivement $10,0 \pm 1,6$ kPa et $8,6 \pm 1,9$ kPa. Les valeurs de viscosité de TG_HCa et TG_HDMEM sont du même ordre de grandeur alors que celle de TG_BCa est un ordre de grandeur plus basse (figure 3.3-C). Cette différence de viscosité, associée à un coefficient de variation de 114 %, laisse penser que cette valeur pourrait être erronée. Comme les mesures ont été effectuées sur des échantillons produits en même temps pour chaque condition, il est probable que ce résultat soit lié à un défaut de réticulation.

3.2.2 Echelle mésoscopique : micro-indentation

Les propriétés mécaniques à l'échelle mésoscopique ont été analysées par micro-indentation. Cette technique est simple et rapide à mettre en place. De plus, elle permet d'obtenir les propriétés élastiques des matériaux localement au comportement mécanique local des échantillons, rendant ainsi possible d'évaluer leur hétérogénéité.

La mise en place de mesures d'indentation pertinentes sur nos construits constitués d'hydrogel humide a nécessité une optimisation des conditions de manipulations. Dans un premier temps, les mesures d'indentation ont été réalisées dans l'air. Cependant, l'adhésion entre la surface des construits et l'indenteur biaisait les résultats (figure 3.4-A et B). En effet, bien qu'il existe différentes méthodes pour prendre en compte l'effet de l'adhésion dans le calcul du module d'élasticité, dans notre cas la zone d'adhésion était très bruitée, ce qui rendait difficile la détection du point de rupture de contact entre l'indenteur et l'échantillon (figure 3.4). Nous avons également dû tenir compte de l'impact d'une déshydratation des construits sur leurs propriétés mécaniques. En effet, les construits étant constitués à plus de 90 % d'eau, les mesures dans l'air risquaient de les déshydrater, et donc de perturber leurs caractéristiques mécaniques. Nous avons donc par la suite analysé nos échantillons en condition immergés dans du PBS. Contrairement à d'autres études qui ont eu recours à des surfactants pour s'affranchir des effets d'adhésion [249, 250], dans notre cas l'immersion dans du PBS a permis de les rendre négligeables

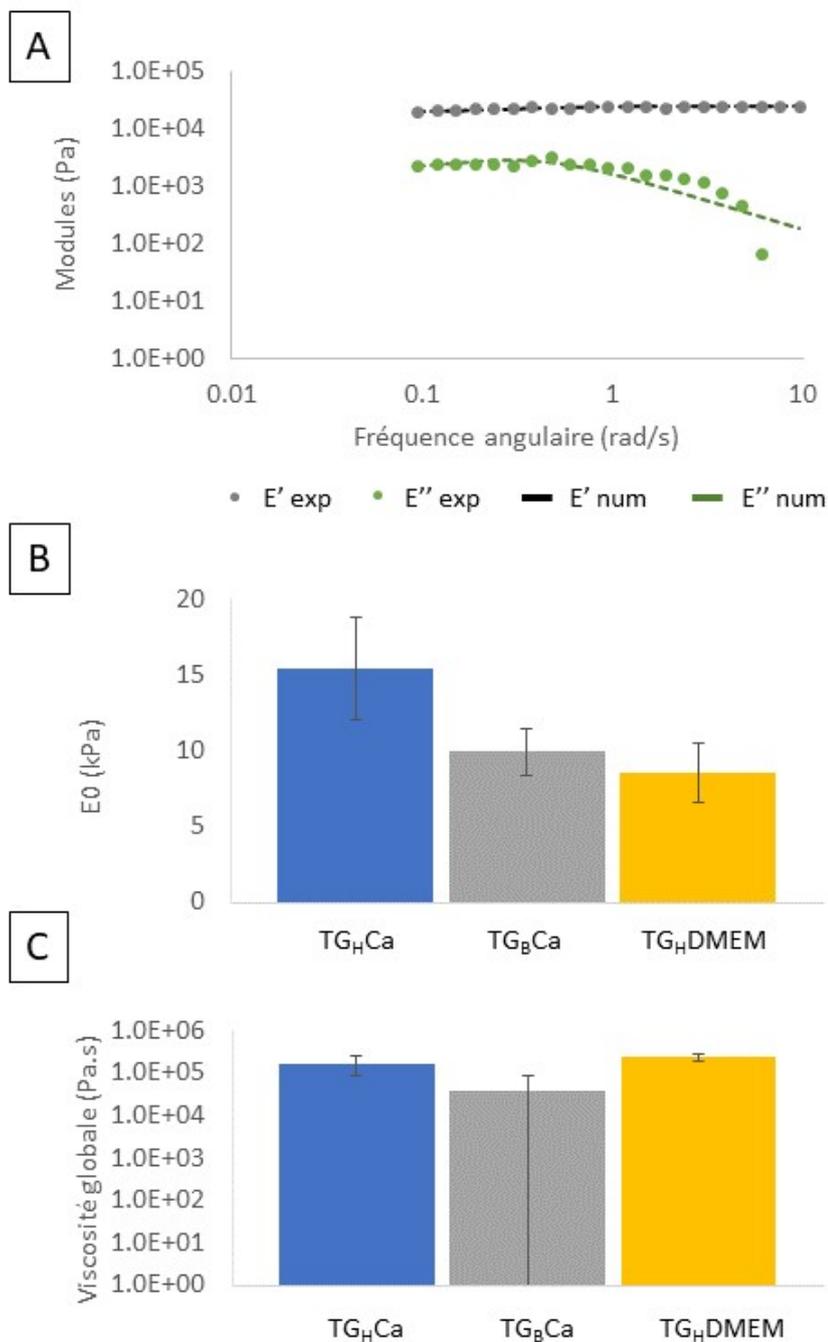


FIGURE 3.3 – Comparaison des essais de DMA pour les trois conditions. A : Exemple de modules de stockage (E' exp) et de perte (E'' exp) expérimentaux et ajustés par un modèle de Maxwell généralisé à deux branches (E' num et E'' num). B : Module d'élasticité E_0 extraits à partir de ce modèle. C : Viscosité globale extraite à partir du modèle. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

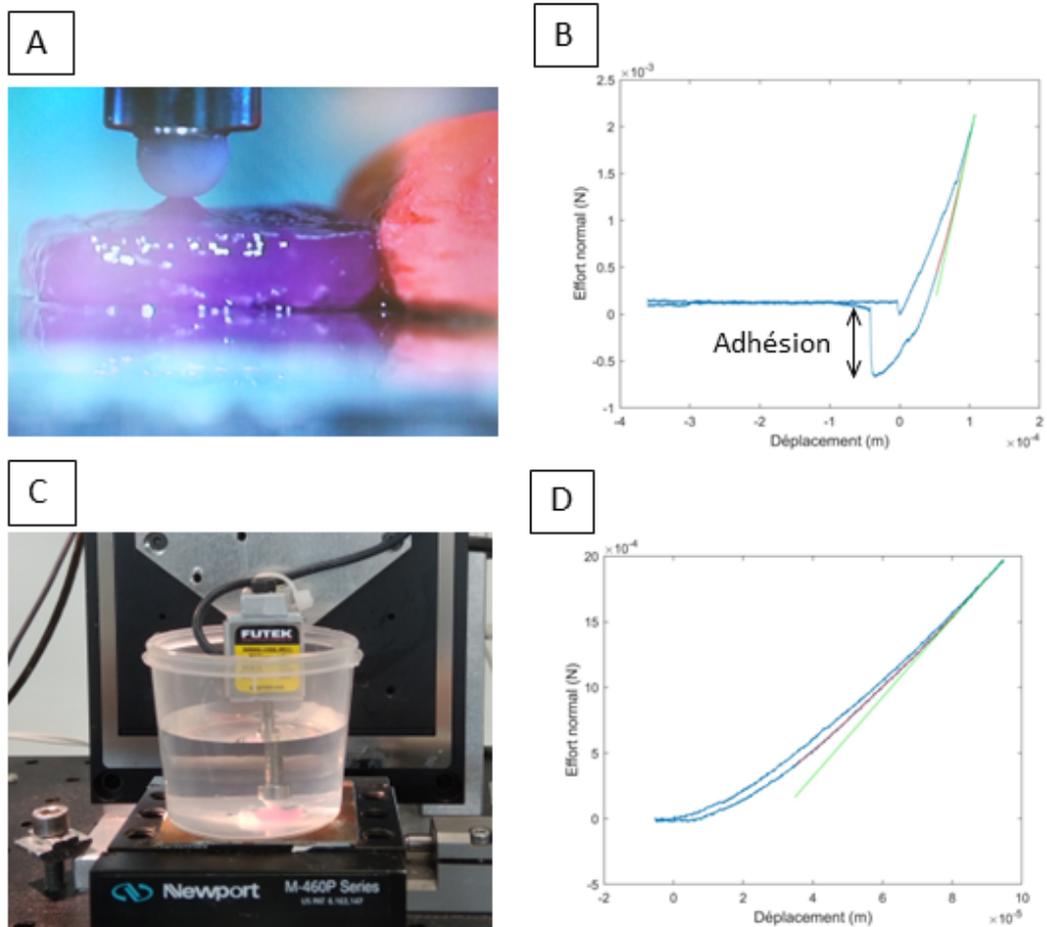


FIGURE 3.4 – Correction des effets d’adhésion entre les construits et l’indenteur grâce à la réalisation des mesures en immersion. A : Adhésion entre un construit bio-imprimé et l’indenteur lors de la phase de retrait (essai réalisé à l’air). B : Courbe de charge/décharge qui montre une zone d’adhésion (forces négatives) lors du retrait de l’indenteur (essai réalisé à l’air). C : Indentation en immersion. D : Courbe de charge/décharge réalisée en immersion : disparition des forces d’adhésion entre l’indenteur et le construit.

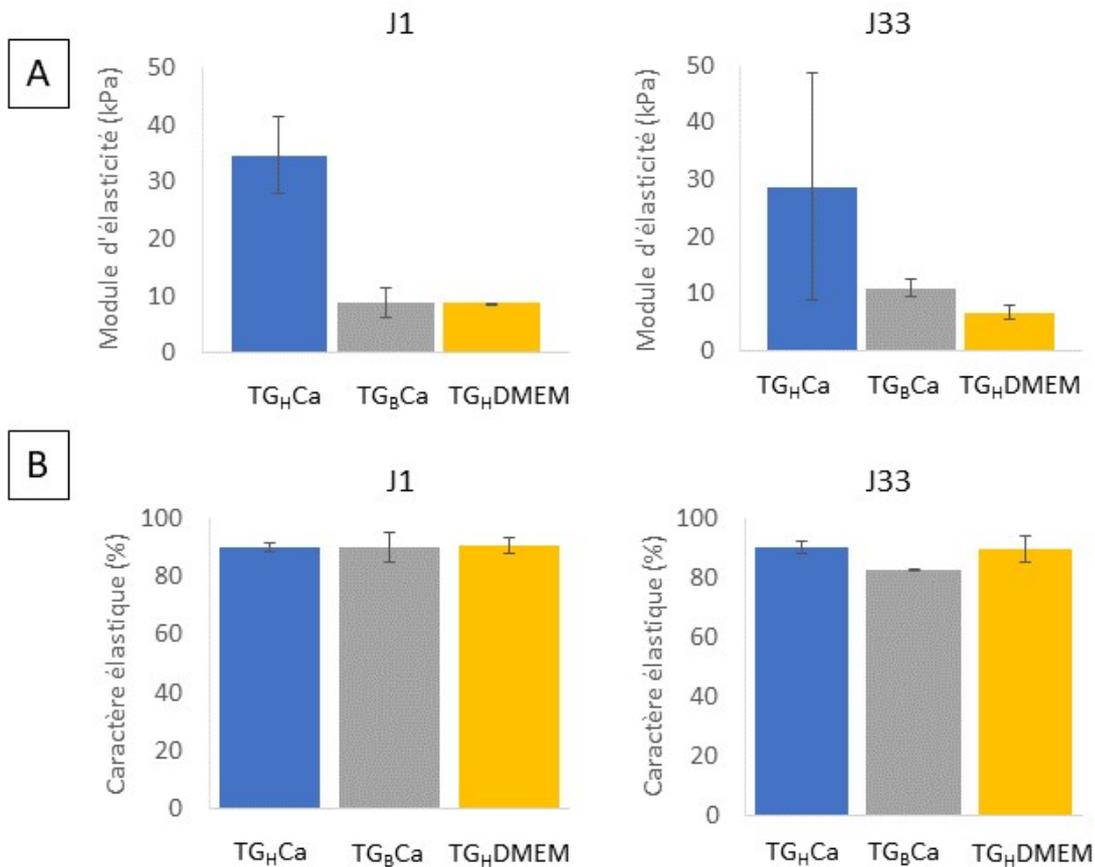


FIGURE 3.5 – Résultats des essais de micro-indentation après 1 jour et 33 jours d'incubation dans du milieu de culture. A : Modules d'élasticité. B : fraction élastique. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

(figure 3.4-D).

Une fois que les effets d'adhésion ont été supprimés, le module d'élasticité a pu être calculé à partir de la raideur à la décharge en exploitant les équations présentées dans le chapitre 2 section 2.3.7.2. Les essais d'indentation ont été réalisés au début (premier jour) et à la fin (trente-troisième jour) de la période de maturation (figure 3.5). Ainsi, nous avons pu observer que les modules d'élasticité des construits étaient stables au cours du temps quelles que soient les conditions. Des tendances similaires à celles observées lors des analyses réalisées par DMA permettent de distinguer deux comportements biomécaniques distincts : les modules d'élasticité des construits de la condition TG_HCa sont les plus élevés tandis que ceux des construits des conditions TG_BCa et TG_HDMEM sont similaires. Les modules d'élasticité des construits TG_HCa sont environ trois fois plus élevés que ceux des deux autres conditions.

L'aire sous la courbe de charge est représentative du travail total W_T de la force F

nécessaire pour enfoncer l'indenteur dans le matériau d'une profondeur δ_{max} . Ce travail est défini par :

$$W_T = \int_{\delta=0}^{\delta_{max}} F d\delta \quad (3.1)$$

L'aire sous la courbe de décharge est représentative du travail élastique W_E (restitué par le matériau) et défini par :

$$W_E = \int_{\delta=0}^{\delta_{max}} F^D d\delta \quad (3.2)$$

où F^D désigne les valeurs de force mesurées sur la portion de décharge.

Le caractère élastique C_e est défini comme le ratio entre le travail élastique et le travail total :

$$C_e = \frac{W_E}{W_T} \quad (3.3)$$

Le premier jour, quelles que soient les conditions, les construits ont un caractère élastique similaire de 90 %. Après 33 jours, les valeurs de caractère élastique de TG_HCa et TG_HDMEM ont été conservées, tandis que celle de TG_BCa a diminué de 8 %. Cette diminution de la fraction élastique traduit une augmentation de l'énergie dissipée par le construit, ce qui est lié à un accroissement du caractère viscoélastique du matériau.

3.2.3 Echelle nanométrique : microscopie à force atomique (AFM)

Les mesures de propriétés mécaniques de nos construits à l'échelle microscopique ont été réalisés par AFM. Cette méthode permet de caractériser les propriétés mécaniques à l'échelle des molécules de polymère qui entourent les cellules.

Les résultats des essais d'AFM sont présentés en figure 3.6. Les mesures ont été réalisées à la fois sur les parois extérieures des construits bio-imprimés et à l'intérieur après avoir coupé les construits à l'aide d'un scalpel. Comme pour les essais d'indentation réalisés après un jour d'incubation à 37 °C, la dissipation visqueuse est faible. Cela valide l'utilisation du modèle de Hertz pour les matériaux élastiques lors du calcul des modules d'élasticité. Les construits des conditions TG_HCa et TG_BCa présentent des modules d'élasticité du même ordre de grandeur alors que celui de la condition TG_HDMEM est environ deux fois plus faible. En ce qui concerne les mesures réalisées à l'intérieur des construits, le module d'élasticité mesuré au centre de la condition TG_HCa était équivalent à celui des parois extérieures. En revanche, nous n'avons pas pu obtenir de mesure à l'intérieur des construits TG_BCa et TG_HDMEM car les pointes AFM utilisées n'étaient pas adaptées pour des matériaux aussi mous. Certaines pointes plus souples, mais non

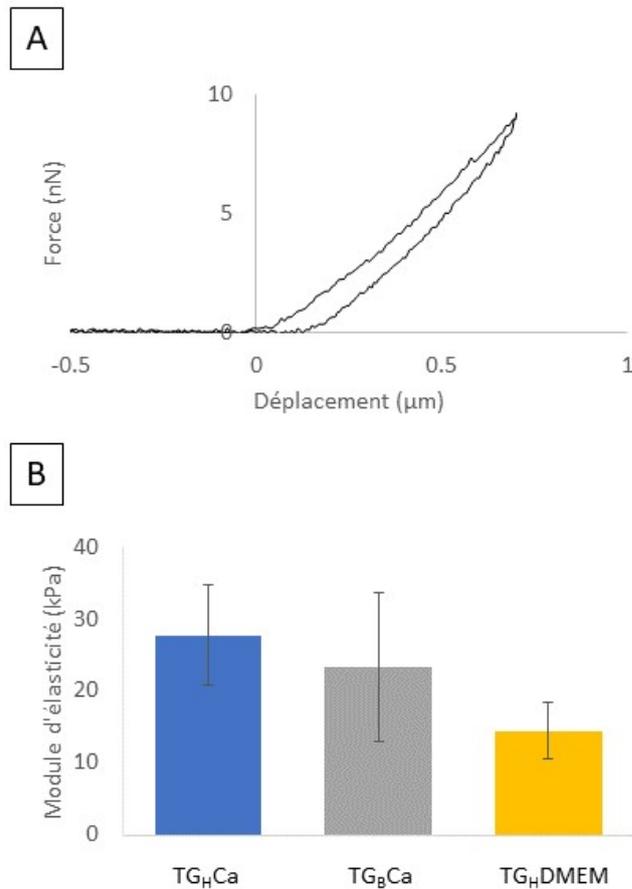


FIGURE 3.6 – Spectroscopie de force par AFM. A : Exemple de courbe d’approche/retrait réalisée sur un construit bio-imprimée. B : Modules d’élasticité calculés sur les parois extérieures des construits. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

disponible pour ces essais, auraient sans doute permis de réaliser ces mesures.

3.2.4 Discussion

Les propriétés mécaniques des construits réticulés ont été mesurées par trois méthodes qui apportent des informations complémentaires. La DMA fournit une mesure à l'échelle macroscopique de l'échantillon. Le module d'élasticité obtenu par cette méthode est influencé par la porosité introduite par les défauts d'impression, notamment les bulles d'air et l'excès ou le manque de matière causés par la sur- ou sous-extrusion. L'indentation offre une échelle intermédiaire entre la DMA et l'AFM. Si l'échantillon absorbe plus de liquide, cela impactera principalement les résultats d'indentation et de DMA. L'AFM permet d'évaluer l'hétérogénéité de la matrice. Les résultats ont notamment montré que l'immersion des construits dans des solutions de réticulation provoque la formation d'une couche plus rigide sur l'extérieur de certains construits.

Les ordres de grandeur des modules d'élasticité obtenus pour toutes les techniques sont similaires. De plus, quelle que soit la méthode utilisée, les modules d'élasticité de la condition TG_HCa sont plus élevés que ceux des autres conditions. Ces résultats étaient attendus car la solution de réticulation utilisée dans cette condition présentait la plus forte concentration en agents de réticulation (calcium et transglutaminase). Ceci a donc permis de créer une densité de liaisons entre les molécules d'alginate et de gélatine plus élevée. Or, plus la densité de liaison entre les polymères du matériau est élevée, plus le matériau a un module d'élasticité élevé [102, 245]. Les valeurs des modules obtenus sont également cohérentes avec ce qui est rapporté pour des hydrogels d'alginate ou de gélatine dans la littérature. Les modules d'élasticité des hydrogels de gélatine varient de 1 kPa à 30 kPa selon les études [247, 248, 251-254]. Les résultats dépendent du type de gélatine utilisée (extraction acide ou basique), de son nombre de bloom (relié à sa masse moléculaire), des concentrations en gélatine et en transglutaminase et de la température de réticulation. En effet, si la température est suffisamment basse pour que la gélatine solidifie avant l'action de la transglutaminase, la structure en triple hélice de la gélatine sera stabilisée par les liaisons covalentes formées par la transglutaminase [246, 248, 253]. Les modules d'élasticité des hydrogels d'alginate sont similaires, avec des valeurs de 1 kPa à 30 kPa [255-257]. Les résultats dépendent du ratio d'acides guluroniques et d'acides mannuroniques qui composent le polymère, de la masse moléculaire du polymère, ainsi que du choix du cation utilisé pour la réticulation [258-260]. Une réticulation plus lente favorise l'homogénéité et augmente les propriétés mécaniques des hydrogels obtenus [259].

La transglutaminase utilisée pour réticuler les molécules de gélatine forment des liaisons covalentes entre les résidus lysine et glycine qui représentent respectivement 3 % et 8 % des acides aminés composant la gélatine [247, 261-263]. Les matériaux avec des liaisons covalentes ont un comportement élastique, à cause de la persistance des liaisons même sous contrainte. En effet, les énergies de liaison des liaisons covalentes sont les plus élevées des liaisons existantes entre les molécules. Or, plus l'énergie de liaison est élevée,

plus la réorganisation du réseau de polymère est difficile [102, 245]. Cela explique que les construits réticulés avec 4 % de transglutaminase (TG_HCa et TG_HDMEM) conservent leur élasticité pendant les 33 jours de culture. En revanche, Le comportement mécanique des construits TG_BCa semble passer d'un comportement élastique le premier jour à un comportement viscoélastique après 33 jours de culture. Le premier jour, la gélatine non réticulée est encore partiellement présente dans le matériau et lui confère son caractère élastique. Au cours du temps, elle est relarguée dans le milieu de culture. Après 33 jours, la contribution relative des liaisons entre les molécules d'alginate augmente. Or, les liaisons entre les molécules d'alginate sont des liaisons de type métal-ligand dont l'énergie de liaison est jusqu'à 2 fois plus faible que celle des liaisons covalentes. Lors de l'application d'une contrainte, ces liaisons peuvent se rompre et se reformer, contribuant ainsi à dissiper l'énergie fournie lors de l'application de contraintes [245, 255]. Cela explique la transition élastique/viscoélastique observée. Les conditions TG_HDMEM et TG_BCa donnent des modules d'élasticité équivalents, mais le caractère élastique de TG_BCa diminue au cours du temps. **Il sera donc possible d'utiliser ces conditions pour comparer la réponse de cellules à un matériau avec un module d'élasticité instantané équivalent mais avec des propriétés viscoélastiques différentes.**

Plusieurs études ont montré un impact de la viscoélasticité sur le comportement des cellules. Pour cela, les chercheurs ont créé des matériaux avec un module d'élasticité instantané équivalent mais des comportements viscoélastiques différents. La variation du comportement viscoélastique a généralement été obtenue en modifiant la composition de l'hydrogel. Ainsi, Bartnikowski *et al* [264] ont introduit de la gomme gellane dans des hydrogels de gélatine méthacrylée pour augmenter le comportement viscoélastique et reproduire le comportement du cartilage articulaire. Cameron *et al* [265] et Fitzgerald *et al* [266] ont utilisé différents ratios de monomères et d'agents de réticulation pour former des gels de polyacrylamide. Des gels de modules de stockage G' identiques de 4,5 kPa mais avec des modules de perte G'' de 1 à 130 Pa ont été obtenus. L'inconvénient majeur de cette méthode est que la réticulation du polyacrylamide se déroule dans un environnement sans oxygène, ce qui implique que les cellules doivent êtreensemencées après la formation du gel, et non pas avant comme c'est le cas en bio-impression. En jouant sur la masse moléculaire des molécules d'alginate, la concentration en calcium et en insérant des molécules pour imposer un espacement entre les chaînes d'alginate, Chaudhuri *et al* ont obtenu des hydrogels avec des modules instantanés de 8 kPa et des temps de relaxation variant de 1 minute à 1 heure. **Il est notable qu'en adaptant les concentrations de transglutaminase et de calcium, nous avons également obtenu des matériaux avec un module d'élasticité similaire mais des comportements viscoélastiques différents. Dans notre cas, la composition de la solution de réticulation est le seul paramètre qu'il a été nécessaire de modifier pour augmenter la viscoélasticité de nos matériaux.**

Certaines études qui réalisent leurs construits par moulage mélangent l'agent de réticulation dans la solution de polymère. Cela permet une réticulation plus homogène

et évite l'effet de formation d'une couche plus rigide à l'extérieur. En effet, Broderick *et al* [247] ont montré que les construits moulés préparés avec la gélatine en solution avec la transglutaminase étaient plus résistants que les construits incubés dans la solution de transglutaminase. Il est probable que cela soit dû à un problème de diffusion de la solution de réticulation à l'intérieur de le construit. Dans notre cas, la durée de l'impression étant supérieure au temps de réticulation, il est donc impossible d'utiliser ce procédé. La différence notable de consistance et d'homogénéité des matériaux est le résultat de la méthode de réticulation choisie. En effet, les parois extérieures en contact direct avec la solution de polymérisation ont des modules d'élasticité plus élevés que le centre des construits que les agents de réticulation devaient atteindre par diffusion passive.

Pourtant il est important de souligner deux limitations principales de nos stratégies pour moduler les propriétés mécaniques de nos hydrogels réticulés : d'une part, la non homogénéité mécanique de certaines de nos conditions, et d'autre part, la prise en compte uniquement des propriétés élastiques et viscoélastiques de nos construits. Ces deux points sont discutés ci-dessous.

La caractérisation des propriétés mécaniques de nos construits n'est pas complète. Elle se limite à une caractérisation des propriétés mécaniques élastiques et viscoélastiques. Cependant, il a été montré que certains hydrogels avaient un comportement poroélastique. En effet, dans les hydrogels, la réponse mécanique à une sollicitation est généralement due à deux phénomènes : la déformation de la structure des chaînes de polymère, qui cause la viscoélasticité, et le mouvement de l'eau entre le réseau de polymère, responsable de la poroélasticité [245]. Cependant, les deux phénomènes n'ont pas lieu aux mêmes échelles. La viscoélasticité est liée à une succession de rupture et de reformation des liaisons entre les molécules et résulte en un changement de forme à volume constant. En revanche, la poroélasticité est causée par les déplacements des molécules de solvant (généralement l'eau). Le nombre de molécules d'eau diminue localement, ce qui résulte en un changement de volume de l'hydrogel. Il est possible de s'intéresser uniquement à la viscoélasticité tant que le temps de diffusion des molécules est supérieur aux temps de relaxation et de mesure, ce qui est généralement le cas lors des mesures à l'échelle du scaffold entier. Dans notre cas, l'étude de la poroélasticité pourrait apporter des informations complémentaires. En effet, celle-ci participe aux mouvements du solvant au sein du matériau, et donc au transport des nutriments, et pourrait avoir une influence importante sur le métabolisme des cellules bio-imprimées [245].

Les analyses des données des trois méthodes de caractérisation mécanique (DMA, micro-indentation et AFM) indiquent que le lendemain de l'impression, les construits de toutes les conditions ont un comportement principalement élastique. Cependant, après 33 jours d'incubation dans des conditions similaires à celles réalisées pour la maturation des construits cellularisés, les construits de la condition TG_BCa ont adopté un comportement viscoélastique. Quelle que soit l'échelle de mesure, les construits de la condition TG_HCa possèdent le module d'élasticité le plus élevé, ce qui est cohérent avec le fait que la concentration en agents de réticulation était plus élevée. En adaptant les concentrations de transglutaminase et de calcium, nous avons obtenu des matériaux avec un module instantané similaire et des comportements viscoélastiques différents. Les conditions TG_HDMEM et TG_BCa donnent des modules d'élasticité équivalents, mais la fraction élastique de TG_BCa diminue au cours du temps. Il est donc possible d'utiliser ces conditions pour comparer la réponse de cellules à un matériau avec un module d'élasticité équivalent mais avec des propriétés viscoélastiques différentes.

3.3 Effet des conditions de réticulation sur la structure interne des hydrogels

Afin de relier les propriétés mécaniques observées à la caractérisation des structures produites par polymérisation, nous avons observé la nano-structure des construits par microscopie électronique après 33 jours d'incubation dans le milieu de différenciation des ostéoblastes (figure 3.7). Dans toutes les conditions, les images de microscopie électronique révèlent une disparité de micro-structure de l'hydrogel. Au centre des construits, la condition TG_HCa montre des inclusions de matrice moins dense. A l'inverse, dans la condition TG_BCa, certaines zones présentent des amas de fibres qui contrastent avec la dispersion des fibres autour.

La condition TG_HDMEM se distingue des autres par la présence de pores de plusieurs microns de diamètre. Certains pores sont remplis d'agrégats de fibres striées avec une périodicité d'environ 35 nm, soit environ moitié moins que la périodicité du collagène. Lorsque la température de la gélatine diminue, ses molécules forment une triple hélice qui créent des zones de jonction et sont responsables de l'aspect solide [246, 248]. Une périodicité inférieure à 30 nm a déjà été observée sur des molécules de collagène, sans doute à cause d'un niveau d'organisation plus faible ou de l'interaction avec d'autres protéines [267, 268]. Dans notre cas, la gélatine était dans un état solidifié au moment où la solution de réticulation a été ajoutée, donc les triples hélices étaient déjà formées. Le fait que ces formations ne soient pas visibles dans les autres conditions suggèrent que la réticulation de l'alginate entrave la formation des triples hélices de gélatine.

La présence d'hétérogénéité dans les hydrogels réticulés avec des liaisons covalentes,

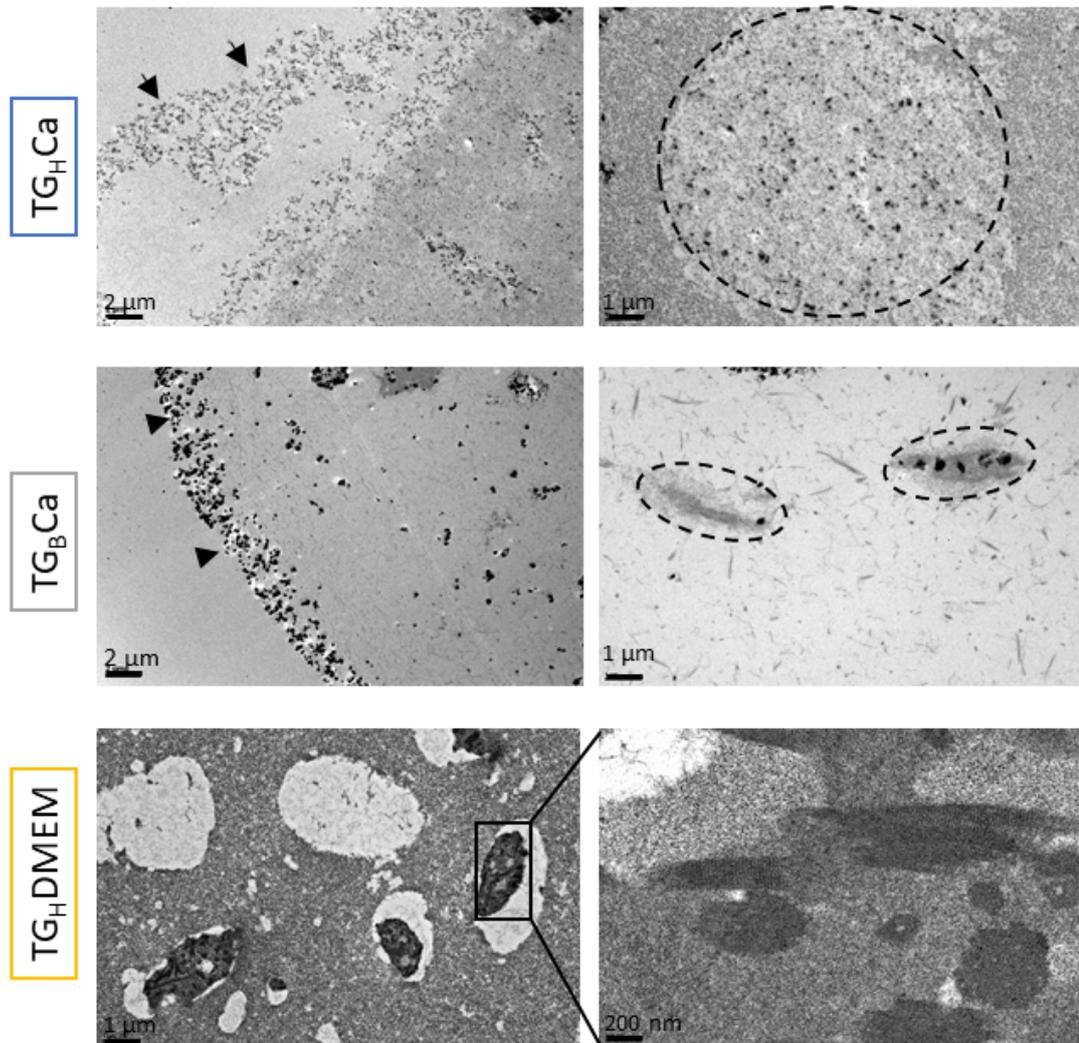


FIGURE 3.7 – Observation des construits bio-imprimés en microscopie électronique à transmission. Les têtes de flèche pointent sur la couche superficielle de matrice peu dense et riche en cristaux de minéralisation. Les pointillés entourent une inclusion de faible densité dans la condition TG_HCa ou à l'inverse des agrégats de fibres plus denses que la matrice environnante dans la condition TG_BCa . Le panneau de droite de la condition TG_HDMEM est un agrandissement d'un pore rempli de fibres striées. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

comme c'est le cas pour les liaisons entre les molécules de gélatine, a déjà été rapportée dans la littérature [269]. Il a notamment été montré que certaines régions comportent une densité de liaison élevée et absorbent peu de liquide, alors qu'à l'inverse d'autres zones pauvres en liaisons absorbent de grandes quantités de liquide. Dans certains cas, il peut même y avoir une séparation de phase et formation de pores remplis de liquide. Cela correspond avec ce qui a été observé sur nos échantillons, avec la présence de zones de fibres denses et d'autres à l'inverse très lâches. Les hétérogénéités de la matrice observées en microscopie électronique expliquent les variations intra-échantillon des modules d'élasticité calculés à partir des données d'AFM.

Les construits sont couverts par une couche de matrice de faible densité contenant des cristaux semblables aux nodules de minéralisation observés après le dépôt d'une nouvelle matrice osseuse [50]. Dans nos construits, ces cristaux se retrouvent également par endroits au centre de l'hydrogel. Afin de confirmer que les cristaux observés sont bien de l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), nous avons effectué une analyse par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie sur les zones présentant ces microstructures. La figure 3.8 montre un exemple des structures analysées ainsi qu'un spectre caractéristique. Les pics de carbone (0,3 keV), de fer (6,5 keV) et de cuivre (8 keV) proviennent de la composition du porte objet et du microscope. Les pics d'osmium (1,9 keV et 9 keV) et d'uranyle (3,614 keV) sont causés par les agents de contrastes utilisés lors de la préparation des échantillons. En revanche, les pics de phosphore (2,01 keV) et de calcium (3,692 keV) confirment la présence d'hydroxyapatite. Il est remarquable que ces cristaux de calcium et de phosphate ne se forment pas lorsque les construits sont cultivés dans du milieu de culture sans β -glycerophosphate. De plus, ils sont également moins présents dans les construits de la condition TG_HDMEM , polymérisés avec une concentration en calcium 150 fois plus faible. Il est donc probable que les ions calcium utilisés pour la réticulation de l'alginate contribuent à la formation de complexe de phosphate de calcium. De plus, la présence de SVF dans le milieu de culture peut contribuer à la minéralisation spontanée, notamment via la présence d'ALP [125].

Les différences de diamètre des construits (figure 3.2), témoins d'une contraction ou au contraire d'une expansion, ainsi que les différences de densité visibles en microscopie électronique (figure 3.7) suggèrent que les fibres qui composent les matrices sont plus rapprochées les unes des autres dans les conditions TG_HCa et TG_HDMEM que dans la condition TG_BCa . Pour vérifier cette hypothèse, la porosité des réseaux de gélatine et d'alginate a été mesurée sur les images de microscopie électronique (figure 3.9-A). Quand la concentration de transglutaminase augmente, la porosité diminue : elle est 1,7 fois plus faible dans la condition TG_HCa que TG_BCa . A l'inverse, quand la concentration en calcium augmente, la porosité augmente : elle est 1,6 fois plus élevée dans la condition TG_HCa que dans la condition TG_HDMEM . Cela signifie que la réticulation du réseau d'alginate par les ions Ca^{2+} entrave la formation d'un réseau dense de gélatine.

La mesure du degré d'alignement des fibres (figure 3.9-B) renseigne sur l'anisotropie du

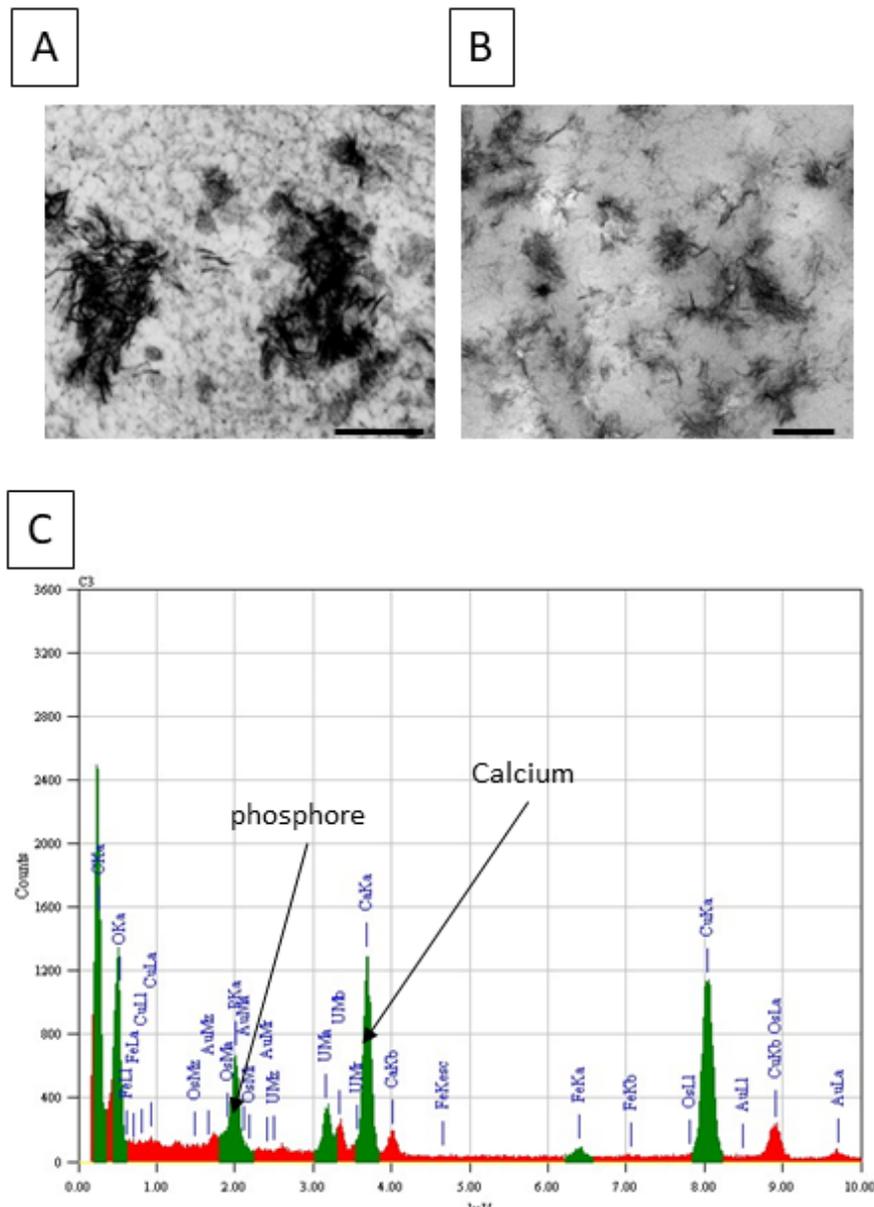


FIGURE 3.8 – Confirmation de la présence de cristaux de minéralisation par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX). A : Image en microscopie électronique à transmission de nodules de calcification (d'après [270]). B : Image en microscopie électronique représentant les nodules analysés. Les structures sombres formées d'un assemblage d'éléments en forme d'aiguilles sont semblables à ce qui est décrit dans la littérature pour les nodules de minéralisation sécrétés par les ostéoblastes. B : Exemple de spectre correspondant à un nodule. La présence des pics de phosphore (2,01 keV) et de calcium (3,692 keV) confirment la présence de minéral. Barre d'échelle 200 nm

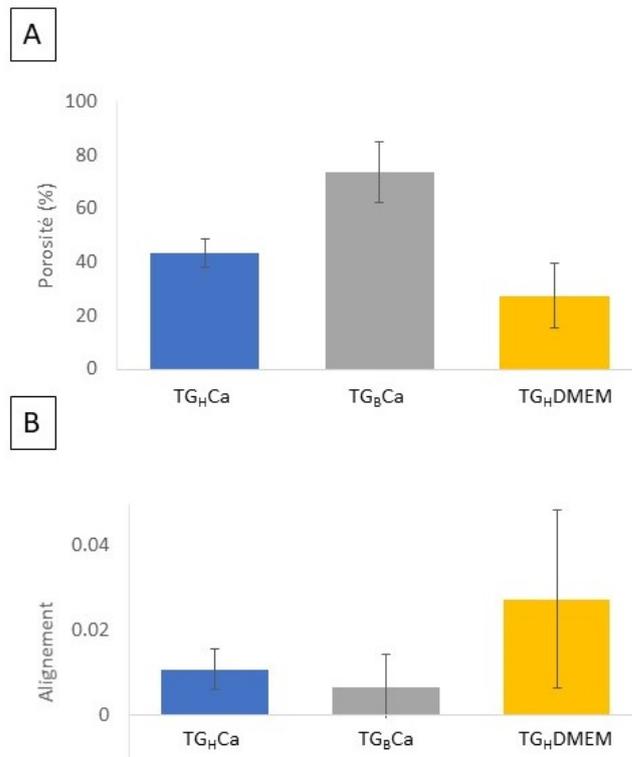


FIGURE 3.9 – Quantification de la porosité (A) et du degré d'alignement (B) des réseaux d'alginate et de gélatine. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

matériau. Une valeur de 0 indique un matériau parfaitement isotrope (sans aucune direction privilégiée) et une valeur de 1 indique au contraire un matériau parfaitement anisotrope (toutes les fibres sont orientées dans la même direction). Le degré d'alignement maximal est obtenue pour la condition TG_HDMEM. Cependant, même pour cette condition, le degré d'alignement est très faible avec une valeur de 3.10^{-2} . Cette valeur très proche de 0 signifie qu'il n'y a aucune orientation privilégiée des fibres. Le coefficient de variation de 77 % pour cette condition peut s'expliquer par une augmentation de la densité des fibres, ce qui introduit de l'erreur lors de leur détection par l'algorithme de traitement des images. L'anisotropie de la matrice environnant les cellules peut impacter leur comportement [271, 272]. Dans notre cas, aucune des conditions ne crée d'anisotropie de la matrice, donc ce paramètre n'influencera pas le comportement des cellules.

L'analyse de la structure des construits bio-imprimés et réticulés avec des concentrations différentes de transglutaminase et de calcium a révélé des hétérogénéités au sein de la matrice. Une minéralisation spontanée a été observée. Elle a été imputée à la liaison des ions calcium, incorporés dans le réseau d'alginate, avec les ions phosphate apportés par le milieu de différenciation des ostéoblastes. La porosité des réseaux d'alginate et de gélatine diminue quand la concentration en transglutaminase augmente. Cependant, la présence de gélatine sous forme de triple hélice et la réduction de la porosité dans les construits réticulés avec une concentration plus faible de calcium montrent que la réticulation du réseau d'alginate interfère avec la formation d'un réseau dense de gélatine. Aucune des conditions de réticulation n'induit d'anisotropie du réseau de fibres.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons cherché à obtenir des construits bio-imprimés avec différentes propriétés mécaniques élastiques et viscoélastiques à partir d'une même composition de bio-encre. L'alginate a été réticulé par ajout de calcium pour former des liaisons ioniques qui contribuent à la viscoélasticité. La gélatine a été réticulée par l'ajout de transglutaminase qui créent des liaisons covalentes contribuant à l'élasticité. Différentes concentrations d'agents de réticulation ont été évaluées pour leur capacité à produire des matériaux qui conservent leur intégrité lors des manipulations nécessaires aux caractérisations mécaniques. Trois conditions ont été retenues et les propriétés mécaniques des construits ont été caractérisées.

Nos hydrogels ont été caractérisés à trois échelles, macro - meso- et nano-scopique par trois méthodes de caractérisation mécaniques, respectivement la DMA, la micro-indentation et l'AFM. Ceci a permis de montrer que les modules d'élasticité des construits obtenus (8 kPa à 30 kPa) reproduisent la gamme de ceux mesurés pour la peau (5 kPa à 30 kPa) [141] ou la matrice osseuse non minéralisée (17 kPa à 37 kPa) [54].

En faisant varier les concentrations d’agents de réticulation, il a été possible de générer des construits avec un comportement viscoélastique similaire mais des modules d’élasticité différents (conditions TG_HCa et TG_HDMEM), ou bien des matériaux avec des modules d’élasticité équivalents mais des comportements viscoélastiques différents (conditions TG_BCa et TG_HDMEM). Ce résultat est particulièrement intéressant car plusieurs études ont montré que le module d’élasticité [54, 174, 273] et la viscoélasticité [257, 265] avaient un impact sur le comportement des fibroblastes et sur la différenciation de cellules stromales mésenchymateuses en ostéoblastes.

Les analyses par microscopie électronique à transmission ont révélé que les conditions de réticulation avaient également un impact sur la densité du réseau d’alginate et de gélatine formé. La diffusion des agents de réticulation au sein des construits créent des hétérogénéités au sein de la matrice, avec des zones de fibres denses, et d’autres au contraire plus lâches. Dans la condition TG_HDMEM, les structures en triple hélice formées par la gélatine pendant la solidification ont été stabilisées par la transglutaminase et sont encore visibles dans certaines zones.

Nous avons donc caractérisé l’impact des conditions de réticulation sur les propriétés mécaniques et structurales des construits bio-imprimés (figure 3.10 et tableau 3.1). L’influence des propriétés des construits produits sur les ostéoblastes et les fibroblastes sera explorée dans les chapitres suivants.

Propriétés	TG _H Ca	TG _H DMEM	TG _B Ca
Type de liaisons majoritaires	Covalentes	Covalentes	Ioniques
Comportement mécanique	Elastique	Elastique	Viscoélastique
Module d’élasticité (kPa)	30	8	8
Porosité (%)	43	24	74

TABLE 3.1 – Synthèse des caractérisations mécaniques et structurales des construits acellulaires.

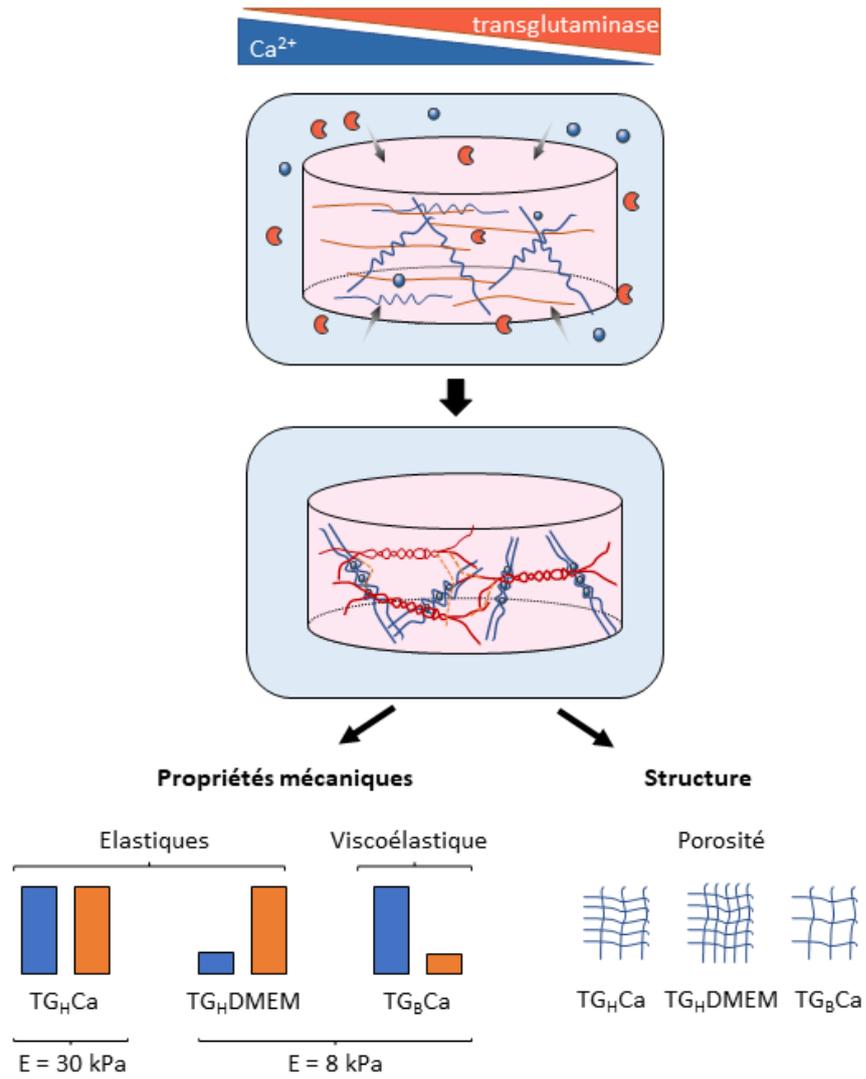


FIGURE 3.10 – Propriétés mécaniques et structurales des construits bio-imprimés.

Chapitre 4

Développement d'un modèle de tissu osseux *in vitro*

Introduction

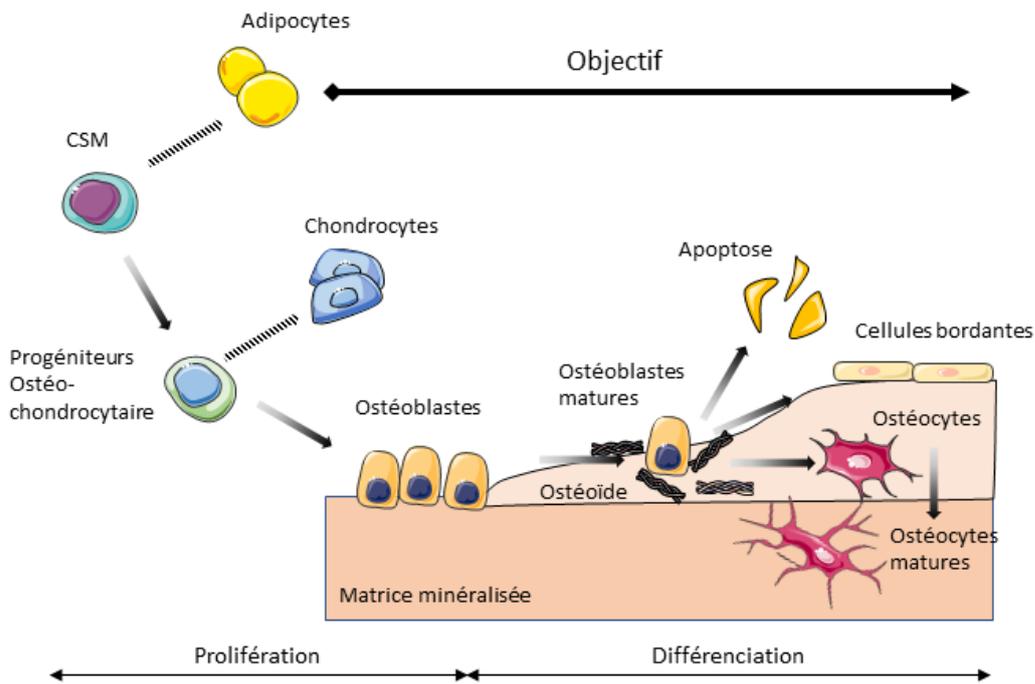
Les modèles d'os *in vitro* s'inscrivent dans le principe de remplacement des expérimentations animales énoncé dans la démarche des 3R (remplacer, réduire et raffiner). Ils permettent l'étude *in vitro* du comportement d'un tissu et de ses cellules, notamment pour comprendre les mécanismes responsables de certaines pathologies, ou pour appréhender l'effet de nouveaux traitements thérapeutiques. La première étape de la production d'un modèle *in vitro* est la reproduction de la physiologie du tissu osseux *in vivo*. Un tel modèle doit satisfaire les critères suivants :

- structuration en trois dimensions au sein d'une matrice extracellulaire représentative de la composition observée *in vivo*,
- matériau permettant un remodelage et une réorganisation par les cellules,
- présence des différentes populations cellulaires et notamment les ostéocytes, responsable de la structure de la matrice extracellulaire de l'os.

Suite à une analyse de la littérature, nous avons déterminé trois facteurs qui influencent l'obtention d'un modèle physiologique. Le premier est la technique de bio-fabrication. La structure en trois dimensions peut être réalisée par bio-impression 3D ou bien par moulage d'une bio-encre. La bio-impression 3D est une technique qui permet de réaliser des construits cellularisés de formes variées de manière reproductible, tout en contrôlant la porosité de l'objet. Cependant, différents travaux ont démontré que les forces de cisaillement générées lors de la micro-extrusion du filament de bio-encre peuvent endommager les cellules [99, 274]. Il importe donc dans un premier temps de vérifier que les ostéoblastes supportent l'étape d'extrusion lors de la bio-impression. Le deuxième facteur à prendre en compte est l'origine des cellules incluses lors de la bio-fabrication. Comme il a été montré dans le chapitre 1 (section a)), les cellules de lignée MC3T3 sont communément choisies pour développer les modèles d'os *in vitro* en raison de leur capacité proliférative élevée, de

la reproductibilité de leur phénotype et de leur capacité démontrée à sécréter une matrice minéralisée en 2D. Au contraire, les ostéoblastes primaires humains sont plus rarement utilisés à cause de leur capacité de prolifération plus faible et de leur variabilité inter donneurs. Néanmoins, comme tous les modèles cellulaires primaires, ils représentent un modèle cellulaire plus représentatif des patients. Enfin, les derniers facteurs qui influencent le modèle sont les propriétés structurales et mécaniques du matériau utilisé. En effet, la porosité et la réponse élastique (ou viscoélastique) des hydrogels sont des éléments déterminants pour le comportement et le devenir des cellules incluses. Dans notre cas, ce dernier paramètre peut être modulé en modifiant les conditions de réticulation de la bio-encre.

Les critères définis plus haut pour reproduire *in vitro* la physiologie du tissu osseux *in vivo* nous ont conduit à sélectionner un certain nombre de marqueurs pour évaluer l'impact des trois facteurs listés précédemment (figure 4.1). L'obtention d'un modèle tridimensionnel sera caractérisée par la viabilité et la répartition des cellules au sein de l'hydrogel. Le remodelage de la matrice sera évalué macroscopiquement par la capacité des cellules à contracter leur matrice et microscopiquement par la présence de fibres contractiles α -SMA dans le cytosquelette des cellules, ainsi que par la sécrétion de protéines matricielles comme la fibronectine et les fibres de collagène. La différenciation des ostéoblastes en ostéocytes sera évaluée par un ensemble de marqueurs : la cinétique de prolifération des cellules, l'activité intracellulaire de la phosphatase alcaline et l'acquisition de marqueurs spécifiques des ostéocytes comme l'extension de dendrites et l'expression du marqueur transmembranaire PHEX (phosphate regulating neutral endopeptidase on the chromosome X).



Marqueurs sélectionnés		
Ostéoblastes	Ostéoblastes matures	Ostéocytes
Prolifération	ALP	Morphologie
Fibronectine	Collagène I	PHEX

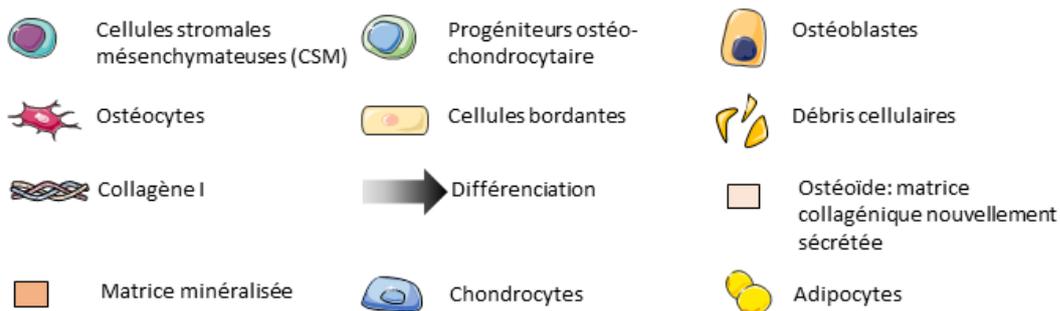


FIGURE 4.1 – Étapes de la différenciation ostéogénique et marqueurs associés. Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM), capables également de se différencier en adipocytes, s’engagent sur la voie ostéo-chondrocytaire. Les ostéoblastes qui prolifèrent ne déposent pas de matrice. L’arrêt de la prolifération marque le début de la différenciation et de la sécrétion de collagène. Quand la sécrétion de matrice est terminée, les ostéoblastes suivent une des trois voies possibles : mourir par apoptose, retourner à un stade quiescent en surface de la matrice (cellules bordantes) ou être progressivement incorporés dans la matrice et devenir des ostéocytes matures au sein de la matrice minéralisée.

4.1 Impact du procédé de bio-fabrication

Nous avons étudié l'impact de la méthode de bio-fabrication par bio-impression ou moulage sur la viabilité, la prolifération, la répartition et la morphologie des cellules au sein d'une bio-encre. Nous avons choisi ici de travailler sur des construits cylindriques de 1 cm de diamètre. La condition de réticulation retenue est TG_HCaCa car c'est celle qui donne le module d'élasticité le plus proche de celui mesuré pour l'ostéoïde [54]. Les construits sont mis en culture pendant 35 jours en présence de facteurs de différenciation tels que décrits dans le chapitre 2, section 2.1.3.

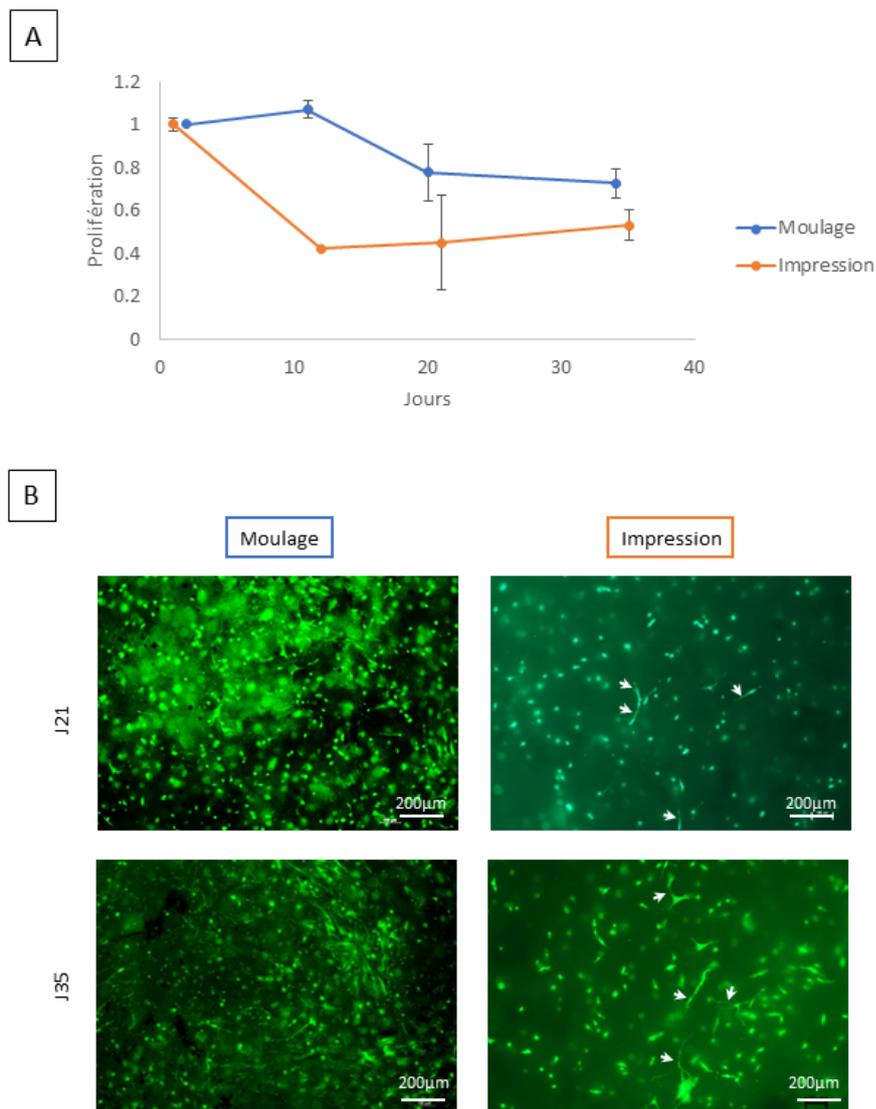


FIGURE 4.2 – Suivi de la prolifération et de la répartition des cellules dans les construits. A : Évolution du nombre de cellules par construit au cours de la maturation. Les données ont été normalisées par le nombre de cellules le premier jour de culture pour les cellules imprimées et le deuxième pour les cellules moulées. B : images prises au microscope des cellules marquées en calcéine AM verte et observées avec un filtre à 475nm (objectif 4X). Les flèches blanches indiquent les dendrites.

Nous avons choisi de suivre la prolifération des cellules avec deux méthodologies complémentaires : d'une part la numération des cellules présentes dans les construits après leur dissociation, et d'autre part par l'observation microscopique des cellules vivantes grâce à un marquage par calcéine AM (figure 4.2).

Il est à noter que ces deux méthodologies quantifient la prolifération cellulaire de façon directe et non pas, comme pour la plupart des travaux présents dans la littérature, de façon indirecte par quantification de l'activité métabolique [107, 114, 115, 275] ou bien de la quantité d'ADN intracellulaire [106, 117]. Ceci permettra de nous affranchir des biais déjà observés pour ces méthodologies (surestimation / sous-estimation du nombre de cellules) [276-278].

Nous avons donc réalisé une étude comparative de l'évolution de construits bio-fabriqués par moulage ou par bio-impression sur une période de 35 jours. Les données ont été normalisées par rapport au nombre de cellules présentes dans les construits aux premiers jours de cultures (à J1 pour l'impression et J2 pour le moulage). Les cinétiques de prolifération ont des tendances opposées. En effet, au sein des construits bio-imprimés, la quantité de cellules diminue de moitié sur les 12 premiers jours de culture alors que pour le moulage cette quantité est stable. En revanche, sur la deuxième phase, le nombre de cellules dans les construits bio-imprimés s'est stabilisé jusqu'à l'arrêt de la culture. Dans le même temps, le nombre de cellules dans les construits moulés a diminué. Après 35 jours de culture, les deux courbes de croissance tendent à se rejoindre (4.2). La densité de cellules vivantes observées après marquage en calcéine AM après 21 et 33 jours de culture est plus faible dans les construits bio-imprimés que dans les construits moulés. Ceci corrobore les résultats obtenus par numération.

En termes de morphologie, l'extension de dendrites dès 21 jours de culture est observée de façon identique entre les deux méthodes de bio-fabrication, et ceci jusqu'à la fin de la culture. La morphologie des cellules a aussi été observée grâce au marquage du cytosquelette d'actine (marquage par la phalloïdine), bien que l'extension de dendrites soient moins visible au marquage phalloïdine qu'au marquage calcéine précédent.

En fin de culture, la répartition spatiale des cellules dans le volume du construit observée par microscopie confocale permet d'observer une répartition homogène dans les deux cas (figure 4.3).

En conclusion, bien que la bio-impression semble avoir un impact à court terme sur la prolifération des ostéoblastes, celle-ci s'est normalisée après 35 jours de culture. Etant donné que l'impression permet une plus grande flexibilité de formes et de porosité, son utilisation sera privilégiée dans la suite de notre étude.

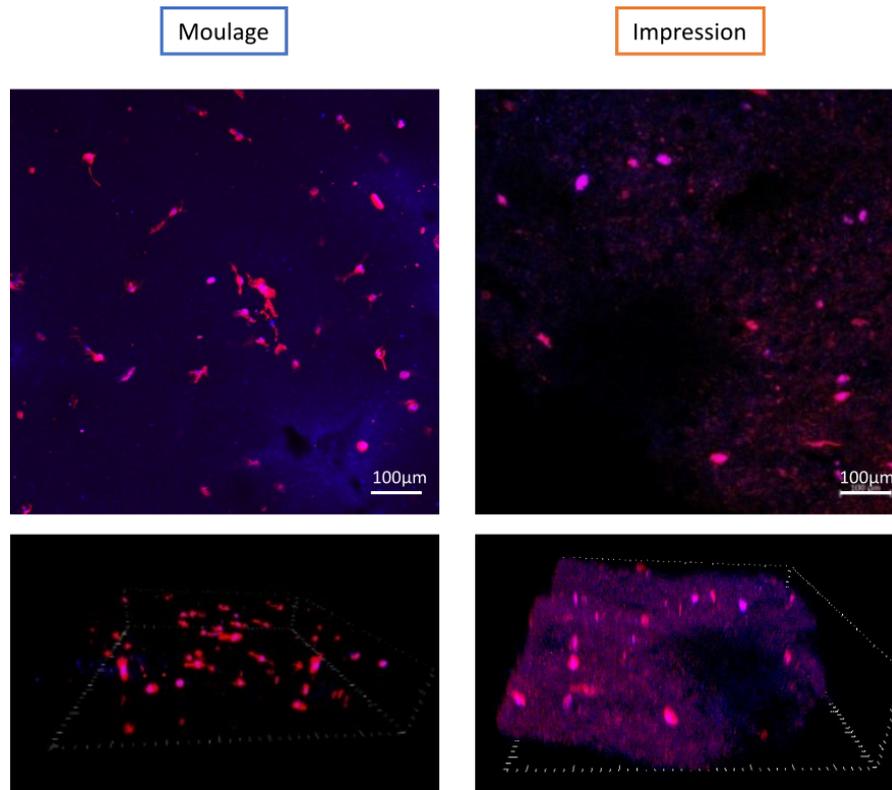


FIGURE 4.3 – Comparaison de la morphologie et de la répartition des ostéoblastes dans les construits moulés ou bio-imprimés. Marquage du cytosquelette d’actine par phalloïdine-Alexa fluor 546 (en rouge) et des noyaux par DAPI (en bleu). Les images de la ligne supérieure sont la projection par intensité maximale des stacks obtenus au microscope confocal (objectif 10X). Sur la ligne inférieure le volume a été reconstruit pour visualiser la répartition des cellules en 3D.

4.2 Sélection du modèle cellulaire

4.2.1 Comparaison des capacités de prolifération et de différenciation des cellules ostéoblastiques en deux dimensions

Nous avons vu dans le chapitre 1 que de nombreuses sources de cellules sont utilisées dans la littérature pour établir des modèles *in vitro* de tissus osseux. Parmi les lignées de cellules les plus utilisées, se trouvent les MC3T3 et les MG-63. D’autres études ont privilégié les cellules primaires, comme les cellules stromales mésenchymateuses (précurseurs des ostéoblastes, comme indiqué en figure 4.1) ou directement des ostéoblastes issus de prélèvements de patients. Nous avons donc comparé des cellules de différentes origines pour leur capacités de prolifération et de production d’une matrice extracellulaire minéralisée selon les protocoles présentés dans le chapitre 2, sections 2.1.1 et 2.1.3. Cette évaluation a été réalisée en culture 2D dans un premier temps afin de sélectionner les modèles cellulaires les plus adéquats pour ensuite les bio-imprimer en 3D. Le tableau 4.1 résume les résultats obtenus en 2D. Les MC3T3 sont les plus rapides à proliférer avec un temps de doublement de 1 jour. A l’inverse, les ostéoblastes primaires sont les plus lents

avec un temps de doublement qui varie de 3 à 7 jours selon les donneurs.

Source de cellules	Lignée ou cellules primaires	Temps de doublement	Densité à confluence	Production d'une matrice minéralisée
HOB	Cellules Primaires	3 - 7 jours	17 000	Oui
BM-MSC	Cellules primaires	3 jours	21000	Oui
MC3T3	Lignée	1 jour	56000	Non
MG-63	Lignée	2 jours	60000	Non
Y201	Lignée	3 jours	38000	Oui

TABLE 4.1 – Capacité de prolifération et de différenciation des cellules utilisées pour la génération de modèles *in vitro* de tissus osseux. HOB : ostéoblastes primaires humains. Le temps de doublement et la densité à confluence varient fortement d'un donneur à l'autre. BM-MSC : cellules stromales mésenchymateuses de moelle osseuse. La densité de cellules des HOB à confluence dépend du donneur.

La figure 4.4 présente la morphologie à confluence des cellules étudiées ainsi que leur capacité de minéralisation. Les puits des ostéoblastes (HOB) et des cellules stromales mésenchymateuses primaires (BM-MSC) et immortalisées (Y201) montrent un marquage positif au rouge alizarine, indicateur de la présence de nodules de minéralisation. En revanche, les cellules des lignées MC3T3 et MG-63 n'ont pas produit de matrice minéralisée, comme le montre l'absence de marquage au rouge alizarine.

S'il a déjà été relevé une inconstance sur la capacité des MG-63 à produire une matrice minéralisée [62], les résultats avec les MC3T3 sont plus surprenants. En effet, il est globalement accepté que la lignée MC3T3 est composée d'une population mixte hétérogène d'un point de vue phénotypique, dont certains clones cellulaires issus de la population originale peuvent perdre leur capacité à minéraliser [279]. Cependant, la population mixte avec laquelle nous avons travaillé devrait être capable de produire une matrice minéralisée [62]. Deux hypothèses peuvent expliquer nos résultats. Premièrement, il est plausible que le lot de SVF sélectionné pour favoriser la minéralisation chez les ostéoblastes primaires ne conviennent pas aux MC3T3 dans les mêmes conditions [280]. Deuxièmement, il est possible que nos conditions de culture aient sélectionné une population présentant un clone majoritaire incapable de minéraliser la matrice extracellulaire en présence de facteurs de différenciation.

A la suite de ces essais, nous avons sélectionné deux origines de cellules pour nos futurs essais : les ostéoblastes primaires et les MC3T3. Dans le cas des ostéoblastes primaires (HOB), nous avons sélectionné un lot de cellules ayant un temps de doublement le plus rapide possible (environ 3 jours contre 7 jours pour le donneur le plus lent). Nous avons

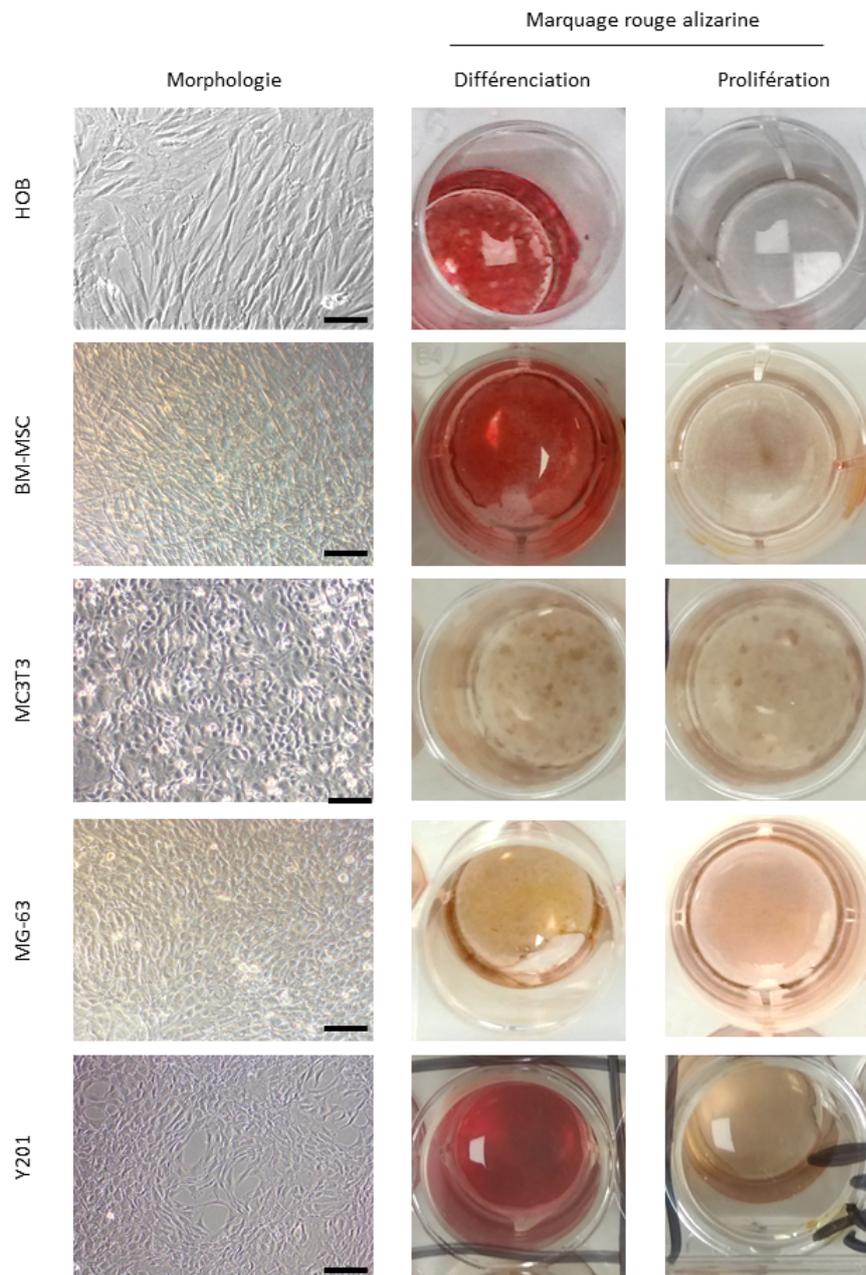


FIGURE 4.4 – Comparaison des morphologies et de la capacité de minéralisation de différentes sources de cellules potentielles pour la réalisation de modèles osseux *in vitro*. La minéralisation est évaluée par fixation et marquage au rouge alizarine après 3 semaines de culture en présence de facteurs de différenciation pour les HOB et 28 jours pour les autres. Les puits cultivés avec du milieu de prolifération servent de témoin négatif. Les images macroscopiques correspondent toutes à des puits de plaque 24 puits. Barre d'échelle 80 μ m.

ensuite choisi les cellules MC3T3 malgré leur absence de minéralisation en 2D comme cellules de référence. En effet, elles restent le modèle de lignée le plus utilisé dans la littérature.

4.2.2 Comparaison du comportement des MC3T3 et des ostéoblastes primaires dans les construits bio-imprimés

Nous avons montré dans la section 4.1 que la bio-impression pouvait être utilisée pour produire des hydrogels ensemencés avec des ostéoblastes. Nous allons maintenant étudier la prolifération, l'acquisition d'un phénotype d'ostéocytes et la capacité de contraction des construits des ostéoblastes primaires (HOB) et des MC3T3 dans des construits bio-imprimés. Comme les propriétés mécaniques et structurales de l'hydrogel ont été identifiées comme des facteurs pouvant influencer la physiologie, deux conditions avec des modules d'élasticité différents ont été évaluées : les construits réticulés avec 4 % de transglutaminase et 3 % de CaCl₂ (TG_HCa), avec un module d'élasticité de 30 kPa, et ceux réticulés avec 0,4 % de transglutaminase et 3 % de CaCl₂ (TG_MCa), avec un module d'élasticité de 10 kPa.

4.2.2.1 Prolifération et répartition des cellules

Les courbes de croissance des deux sources de cellules sont présentées sur la figure 4.5-A. Afin de comparer la prolifération des cellules HOB et MC3T3 ensemencées à des densités différentes, les suivis de croissance ont été normalisés par le nombre moyen de cellules le premier jour de culture pour les HOB et le deuxième jour pour les MC3T3. Le module d'élasticité du matériau a un impact similaire sur la croissance des HOB et des MC3T3 : la prolifération est 3 fois plus élevée dans les construits TG_MCa que TG_BCa.

L'observation des cellules vivantes marquées par calcéine AM révèle également une densité cellulaire des MC3T3 plus élevée que celle des HOB dès 12 jours de culture. Deux types d'organisations cellulaires distinctes sont visibles. Ainsi, alors que les ostéoblastes primaires présentent une morphologie d'ostéocytes avec l'extension de dendrites à partir de 12 jours, les cellules MC3T3 ont conservé une morphologie similaire à celle observée en 2D (fig 4.4). De plus, une répartition non homogène est observée pour les cellules MC3T3 comparativement aux cellules HOB au sein du construit. En effet, à partir de 21 jours de culture, les cellules MC3T3 forment un tapis cellulaire en surface des construits contrairement aux cellules HOB qui se maintiennent dans la profondeur des construits.

Ces observations sont confirmées grâce au marquage hématoxyline sur les coupes histologiques. La figure 4.6 met en évidence une couche de MC3T3 formée en surface du construit pour les deux conditions TG_HCa et TG_MCa. Cette couche cellulaire superficielle ne se retrouve sur aucune des coupes histologiques avec les HOB.

4.2.2.2 Différenciation en ostéocytes

A ce stade de l'étude, nous avons choisi de consolider la caractérisation morphologique de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes par la détection du marqueur ostéocytaire transmembranaire PHEX, en complément de l'analyse de la morphologie.

Le marquage des cellules vivantes par calcéine (figure 4.5-B) dans la section précédente montre que les ostéoblastes primaires ont formé plus de dendrites dans la condition TG_MCa que TG_HCa . Comme la longueur et le nombre de dendrites sont des marqueurs de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes [105], seuls les construits de la condition TG_MCa ont été comparés pour la suite.

Une différence de morphologie a également été observée grâce au marquage immunohistochimique de la protéine transmembranaire PHEX. La figure 4.7 confirme la présence de prolongements cytoplasmiques semblables à des dendrites pour les HOB alors que les MC3T3 sont restées sphériques. Néanmoins, le marqueur PHEX, spécifique des ostéocytes, est exprimé par les deux types cellulaires en fin de culture. Ce résultat est surprenant car la formation de dendrites est considérée comme une étape essentielle de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes. En effet, certains travaux de la littérature ont démontré que son inhibition empêche les ostéoblastes d'atteindre le stade d'ostéocytes [27, 28, 280]. Dans notre cas, l'absence d'extensions cytoplasmiques formant des dendrites chez les MC3T3 ne les a pas empêchées d'exprimer ce marqueur spécifique des ostéocytes. D'autre part, chez les ostéoblastes primaires, les phases de prolifération et de différenciation sont décrites comme étant séquentielles [23]. Dans notre cas, les MC3T3 ont continué de proliférer après 43 jours, tout en exprimant le marqueur PHEX, caractéristique des ostéocytes. Ce comportement a déjà été identifié par McGarrigle *et al* [281] qui ont montré que la différenciation des MC3T3 n'était pas corrélée avec l'arrêt de la prolifération dans leur cas.

4.2.2.3 Phénotype contractile

Les ostéoblastes actifs impliqués dans la réparation de fracture expriment les fibres d' α -SMA [57, 282], ce qui leur confère un phénotype contractile et contribue à réduire la distance entre les deux segments d'une fracture [283]. Le phénotype contractile des MC3T3 et des HOB a donc été évalué d'une part par la capacité des cellules à contracter les construits, et d'autre part par l'expression du marqueur α -SMA.

La figure 4.8 présente la contraction des construits au cours du temps. Des valeurs négatives indiquent un gonflement des construits au cours des premiers jours de culture, dû à l'absorption de milieu de culture par les construits. La surface des construits ensemencés avec les HOB a été réduite de moitié après 35 jours de maturation alors que les MC3T3 n'ont pas été capables de contracter le construit dans la même condition. La phase de contraction des construits par les HOB correspond à la phase de prolifération. Il a été démontré dans la littérature que l'attachement des cellules au construit durant la phase de prolifération des cellules est en partie responsable de la contraction [283, 284]. Cependant, dans notre cas, les MC3T3 ont un taux de prolifération supérieur à celui des HOB. La prolifération seule ne peut donc pas justifier la différence de contraction des cellules.

Afin de comprendre l'origine des différences de contraction entre les sources de cellules,

les fibres d' α -SMA ont été marquées par immunohistochimie. Tous les HOB et les MC3T3 expriment les fibres d' α -SMA après 33 jours de culture. Cela signifie que les MC3T3 expriment un phénotype de cellules contractiles, mais n'ont pas induit de contraction de leur environnement. L'hypothèse la plus probable est que cette différence de capacité de contraction s'explique par la différence de répartition et de morphologie des cellules. En effet, les MC3T3 ont principalement été observées en périphérie des construits. En revanche, les HOB étaient répartis de manière homogène à l'intérieur du construit et ont induit une contraction de 50 % de la taille du construit. De plus, la formation de dendrites a augmenté la surface cellulaire, et donc probablement les points d'ancrage des cellules dans le construit, ce qui participe à générer plus de force de contraction sur le construit.

Les capacités contractiles des MC3T3 ont déjà été étudiées dans la littérature [285-288] mais à notre connaissance, c'est la première fois qu'elles sont comparées aux capacités contractiles des ostéoblastes primaires humains.

En conclusion, les cellules MC3T3, largement utilisées dans la littérature, sont un modèle cellulaire inadapté au développement d'un modèle 3D *in vitro* pour étudier la réponse d'ostéoblastes à leur environnement dans notre cas. En effet, nos MC3T3 et nos ostéoblastes primaires humains (HOB) ont des comportements opposés au niveau de la prolifération, de la morphologie des cellules et de leur capacité de contraction.

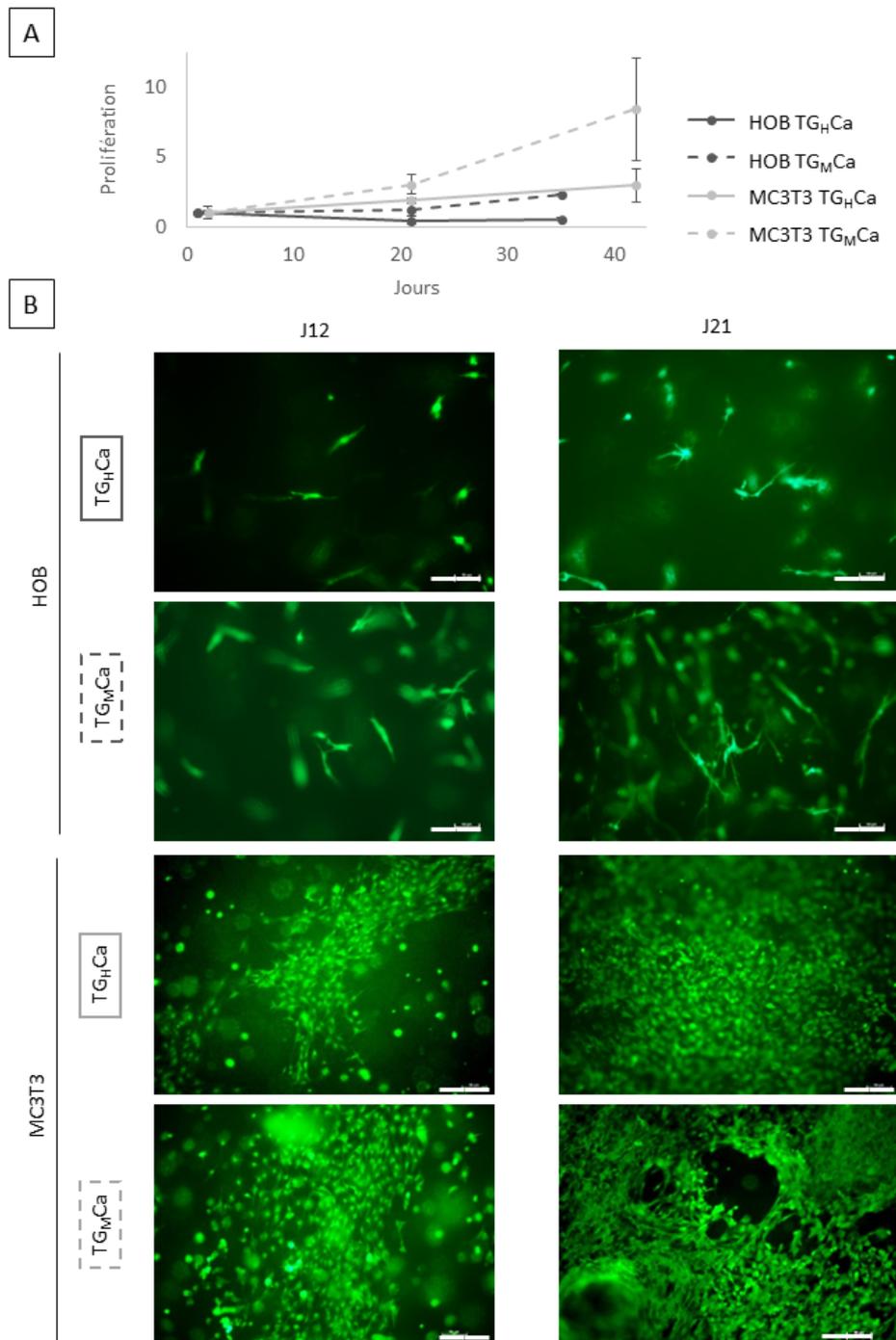


FIGURE 4.5 – Suivi de la prolifération et de la répartition des MC3T3 et des ostéoblastes primaires (HOB) dans les construits. A : Evolution du nombre de cellules par construit au cours de la maturation. Les données ont été normalisées par le nombre de cellules à J1 pour les HOB et J2 pour les MC3T3. B : images prises au microscope des cellules marquées en calceïne AM verte et observées avec un filtre à 475nm (objectif 10X). Barre d'échelle 100 μ m TG_MCa : concentration haute en transglutaminase, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase.

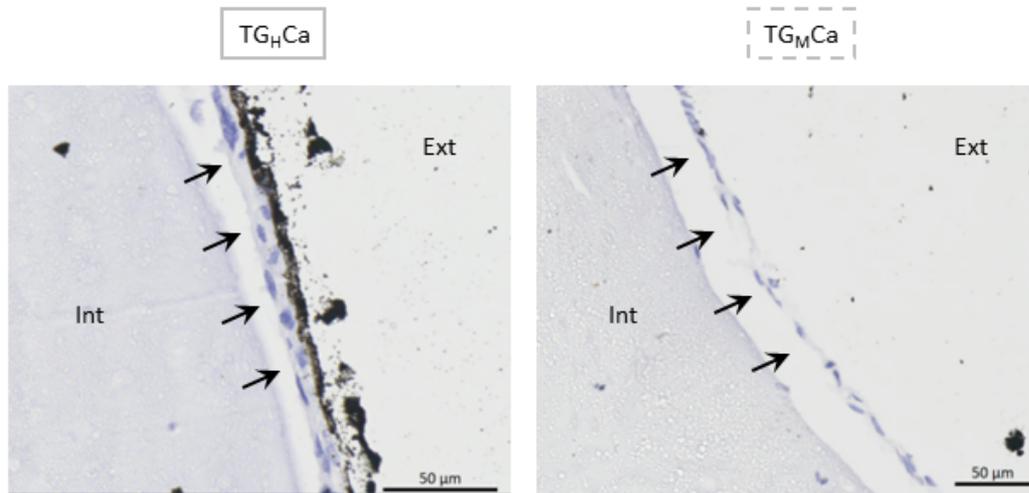


FIGURE 4.6 – Répartition des MC3T3 dans les construits. Les MC3T3 ont formé une couche cellulaire en surface du construit (flèche noire), qui tend à se détacher lors de la coupe. Les noyaux des cellules ont été marqués en bleu par hématoxyline. La couche noire sur la condition TG_HCa correspond à l'encre de chine déposé pour orienter l'échantillon. Int : intérieur du construit, Ext : extérieur du construit. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase.

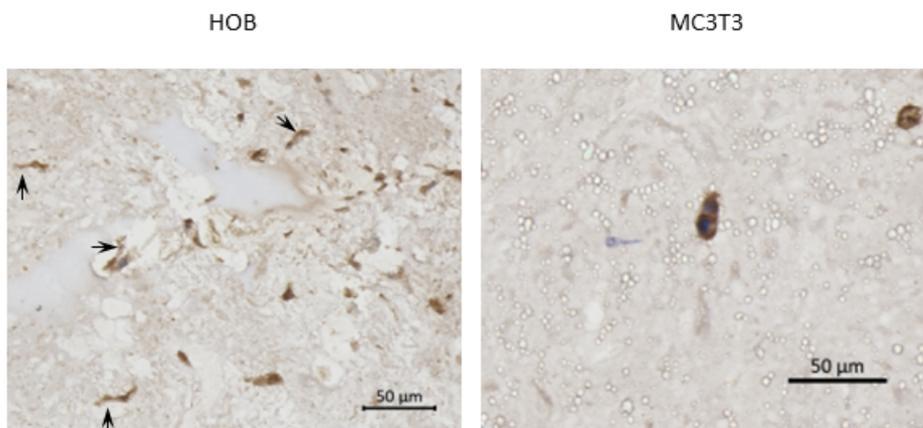


FIGURE 4.7 – Expression du marqueur PHEX spécifique des ostéocytes après 33 jours de maturation. Les cellules exprimant la protéine PHEX sont visualisées en marron et les noyaux en bleu. Les flèches noires pointent les dendrites. TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase. Barre d'échelle 50 µm.

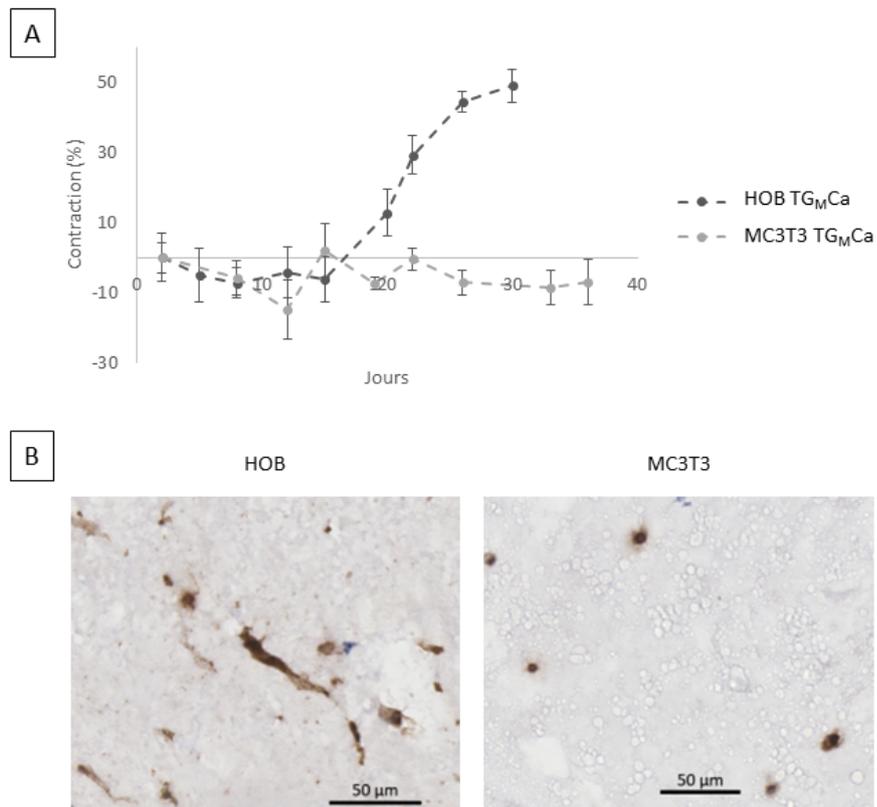


FIGURE 4.8 – Comparaison des phénotypes contractiles des MC3T3 et des HOB. A : Suivi temporel de la contraction des construits. B : Marquage des fibres contractiles d' α -SMA. Les cellules exprimant les fibres d' α -SMA sont visualisées en marron et les noyaux en bleu. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase.

4.3 Effet de la micro-porosité et des propriétés mécaniques des construits sur la physiologie cellulaire

Nous avons ensuite étudié l'effet de la structure et des propriétés mécaniques de l'hydrogel sur le comportement des ostéoblastes primaires. Nous cherchons à déterminer les conditions qui favorisent l'obtention d'un modèle de tissu osseux *in vitro*. Les conditions TG_HCa et TG_HDMEM confèrent la même élasticité mais des modules d'élasticité différents tandis que les conditions TG_BCa et TG_HDMEM confèrent le même module d'élasticité, mais ont des comportements viscoélastiques différents (chapitre 3). Une condition intermédiaire, TG_MCa (0,4 % de transglutaminase + 3 % de CaCl₂), a été rajoutée.

Les modèles *in vitro* sont évalués selon les critères définis en introduction, à savoir la prolifération et la différenciation des cellules en ostéocytes, ainsi que le remodelage de l'hydrogel sur une période de culture de 35 jours (figure 4.9).

Ce criblage a nécessité une étape préliminaire consistant en la validation de l'innocuité des solutions de réticulation sur la prolifération et minéralisation des cellules.

4.3.1 Impact de l'osmolalité sur la prolifération et la minéralisation des cellules

L'ajout de 3 % de CaCl₂ dans la solution de polymérisation élève l'osmolalité de la solution à 648 mOsm/kg, contre 320 mOsm/kg pour le milieu de culture DMEM. Il convient donc dans un premier temps d'étudier l'impact des différentes solutions de réticulation en exposant les cellulesensemencées en 2D aux différentes solutions de réticulation pendant 1 heure (figure 4.10). En effet, plusieurs études ont démontré une réduction de la prolifération quand l'osmolalité dépasse 300 mOsm/kg [289-291].

Le suivi du pourcentage de confluence cellulaire durant 6 jours a permis d'évaluer la viabilité et la prolifération cellulaire. La cytotoxicité a été observée par comparaison des tapis cellulaires immédiatement avant et après incubation avec les solutions de réticulation. Nous avons confirmé que les solutions de réticulation ne provoquent pas de détachement des cellules après 1 heure d'incubation. La cinétique de suivi de la croissance sur 6 jours ne permet pas non plus d'observer de différence de prolifération entre les différentes conditions de polymérisation. Cela signifie que ni l'osmolalité, ni la composition des solutions n'ont d'impact sur la capacité proliférative des cellules après 1 heure de contact avec les solutions de réticulation.

Ensuite, la différenciation des ostéoblastes et leur capacité à produire une matrice minéralisée a été vérifiée. L'identification de la minéralisation par marquage au rouge alizarine des puits cultivés avec du milieu de différenciation est identique pour les différentes solutions de réticulation et pour la condition témoin n'ayant pas été en contact avec les

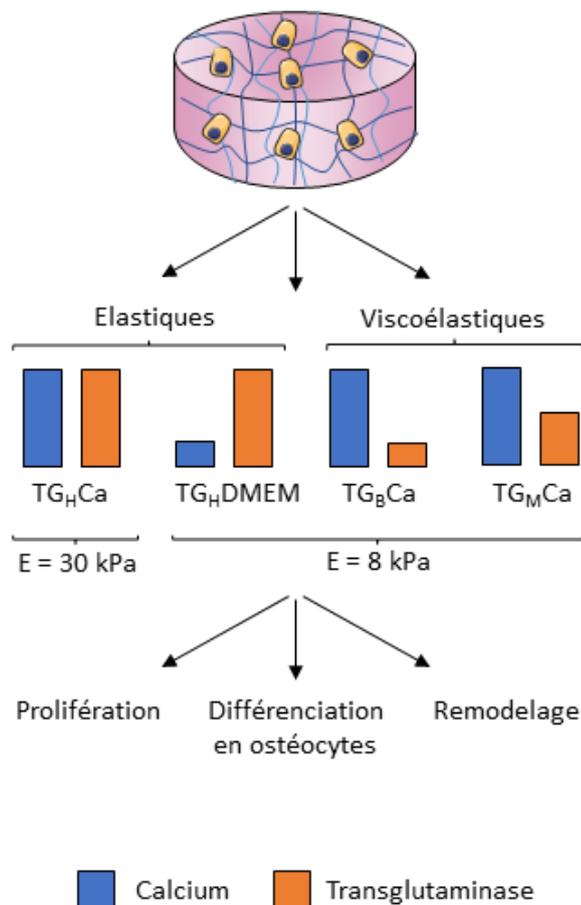


FIGURE 4.9 – Influence des propriétés mécaniques des construit sur les modèles *in vitro* de tissus osseux. Les conditions TG_HCa et TG_HDMEM confèrent la même élasticité mais des modules d'élasticité différents tandis que les conditions TG_BCa, TG_MCa et TG_HDMEM confèrent le même module d'élasticité, mais ont des comportements viscoélastiques différents. L'effet des propriétés mécaniques sur le comportement des cellules est évalué par le suivi de la prolifération, la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes et le remodelage de l'hydrogel.

solution de réticulation. Les puits cultivés avec du milieu de prolifération confirment qu'il n'y a pas de minéralisation spontanée après incubation avec les solutions de polymérisation.

Dans notre cas, et contrairement aux études qui ont établi un impact de l'osmolalité sur la prolifération des cellules, le temps de contact avec les solutions de forte osmolalité reste relativement faible (1 heure). Il est donc probable que le temps d'exposition nécessaire à la réticulation soit suffisamment court pour que les cellules retrouvent un métabolisme normal dans notre cas. Ces résultats confortent également les observations de Huebsch *et al* [292] qui n'ont pas observé d'impact de la concentration en ions utilisés pour la réticulation d'hydrogels d'alginate sur la différenciation de cellules stromales mésenchymateuses en ostéoblastes.

4.3.2 Effet de la micro-porosité et des propriétés mécaniques des construits sur la physiologie cellulaire

4.3.2.1 Croissance cellulaire

La cinétique de prolifération des cellules est présentée en figure 4.11. Deux tendances de prolifération sont observées. Les ostéoblastes n'ont pas proliféré sur toute la période de culture dans les deux construits élastiques polymérisés avec 4 % de transglutaminase (TG_HCa et TG_HDMEM). En revanche, le nombre d'ostéoblastes dans les construits viscoélastiques TG_BCa et TG_MCa a augmenté au cours de la culture.

La plus forte prolifération est observée pour les ostéoblastes dans les construits TG_BCa. La phase de prolifération a duré les 12 premiers jours de culture avec un temps de doublement de 238 h (environ 7 jours). Ils ont ensuite subi une diminution de 26 % entre J12 et J21, avant de se stabiliser autour de 60000 cellules jusqu'à la fin de la culture (35 jours). Il est notable que la cinétique de prolifération observée est typique de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes, à savoir une phase de croissance suivi d'une phase de mort cellulaire. Des tendances de croissance similaires ont été observées par Thrivikraman *et al* [109] : des cellules souches mésenchymateuses humaines dans des hydrogels de collagène ont proliféré les 14 premiers jours puis diminué en nombre jusqu'à l'arrêt de la culture après 21 jours.

Les études de la littérature corrèlent la fin de la prolifération avec le démarrage de la différenciation en ostéocytes [23]. *In vivo*, seul 10 à 20 % des ostéoblastes se différencient en ostéocytes [26], et environ 60 % meurent par apoptose [21]. Il est donc probable que la diminution du nombre de cellules entre J12 et J21 corresponde à l'apoptose d'une partie de la population cellulaire, même si la diminution de 26 % est plus faible que celle observée *in vivo*.

Dans les construits TG_MCa, la prolifération a démarré plus tardivement après 21 jours de culture. Le temps de doublement était légèrement plus long que pour la condition TG_BCa (277 h). Cependant, le même nombre de cellules a été atteint en fin de culture. Une phase de latence cellulaire similaire a été observée par Nasello *et al* [106] avec des ostéoblastes cultivés dans des hydrogels de collagène.

 tant donné que la densité d'ensemencement des cellules dans toutes les conditions est identique, l'absence de prolifération uniquement dans les conditions avec 4 % de transglutaminase ne peut pas être attribuée à une densité initiale trop faible. Le retard de prolifération lorsque la concentration de transglutaminase augmente de 0,2 % à 0,4 % laisse supposer que l'absence de prolifération observée avec 4 % de transglutaminase est synonyme d'une condition non permissive pour la prolifération de ces cellules.

Pour détailler le comportement prolifératif des cellules, leur répartition a été évaluée par le marquage des cellules vivantes en calcéine AM. L'augmentation de la densité de cellules visibles dans les construits TG_BCa ne suit pas la chronologie de la prolifération

évaluée par numération après dissociation. En effet, alors que le maximum du nombre de cellules est atteint après 12 jours de culture, la densité sur les images est maximale en fin de culture où les cellules ne peuvent plus être distinguées individuellement (4.11). De plus, en fin de culture, le nombre de cellules par construit est identique dans les conditions TG_BCa et TG_MCa , or il y a une différence visible de densité cellulaire sur les images. Cela suggère qu'un phénomène de densification du construit plutôt qu'une augmentation du nombre de cellules est responsable de l'augmentation de la densité cellulaire.

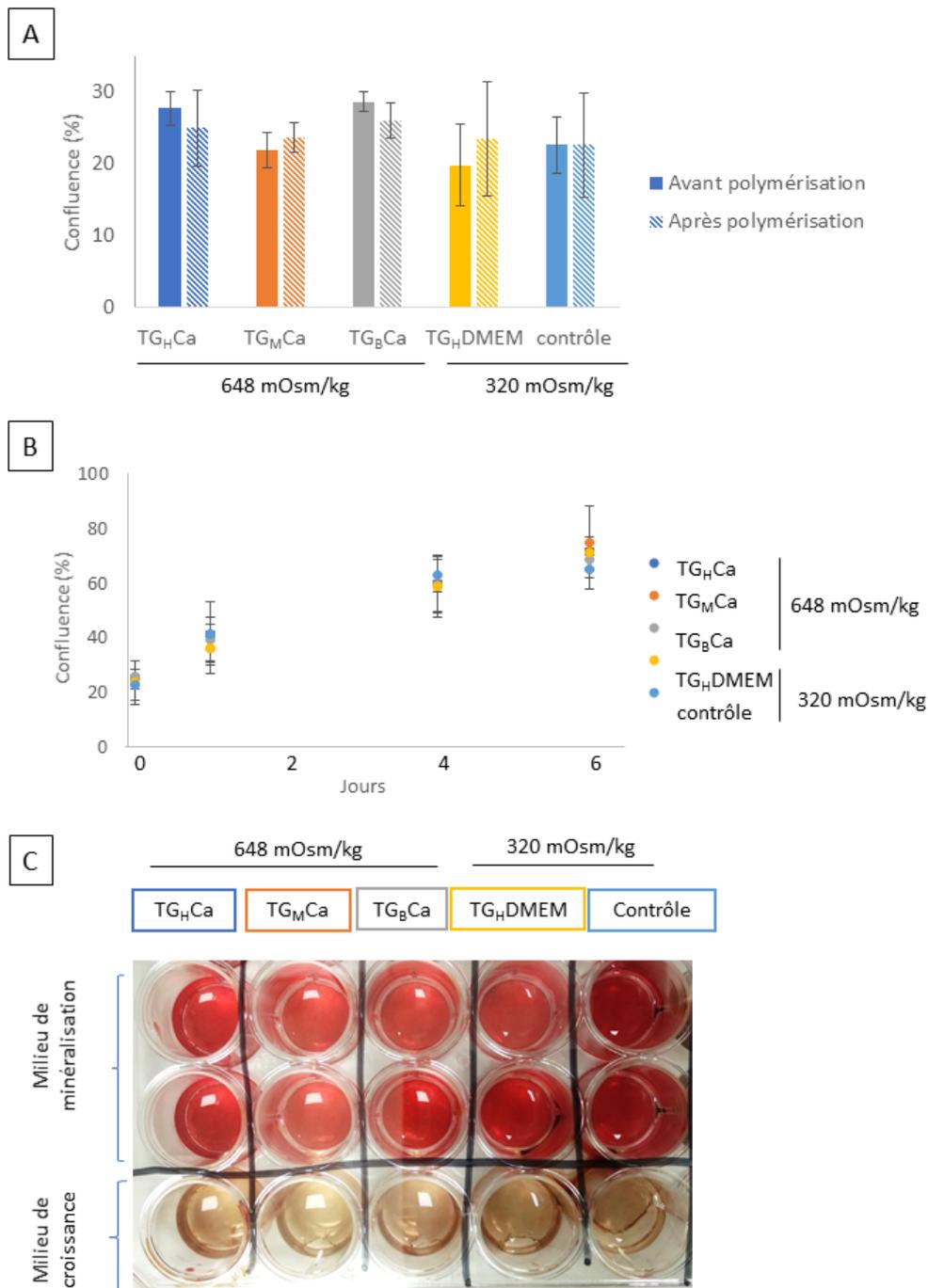


FIGURE 4.10 – Impact de l’osmolalité des solutions de polymérisation sur la prolifération des HOB. A : Pourcentage de confluence mesurée juste avant et après l’incubation avec les solutions de polymérisation. L’osmolalité des solutions est indiquée. B : Suivi longitudinal de la confluence des cellules pendant 6 jours après l’incubation avec les solutions de polymérisation. C : Image macroscopique de la plaque multi puits après fixation et marquage au rouge alizarine. La minéralisation apparaît rouge. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM, Contrôle : milieu de prolifération (DMEM) à la place des solutions de polymérisation.

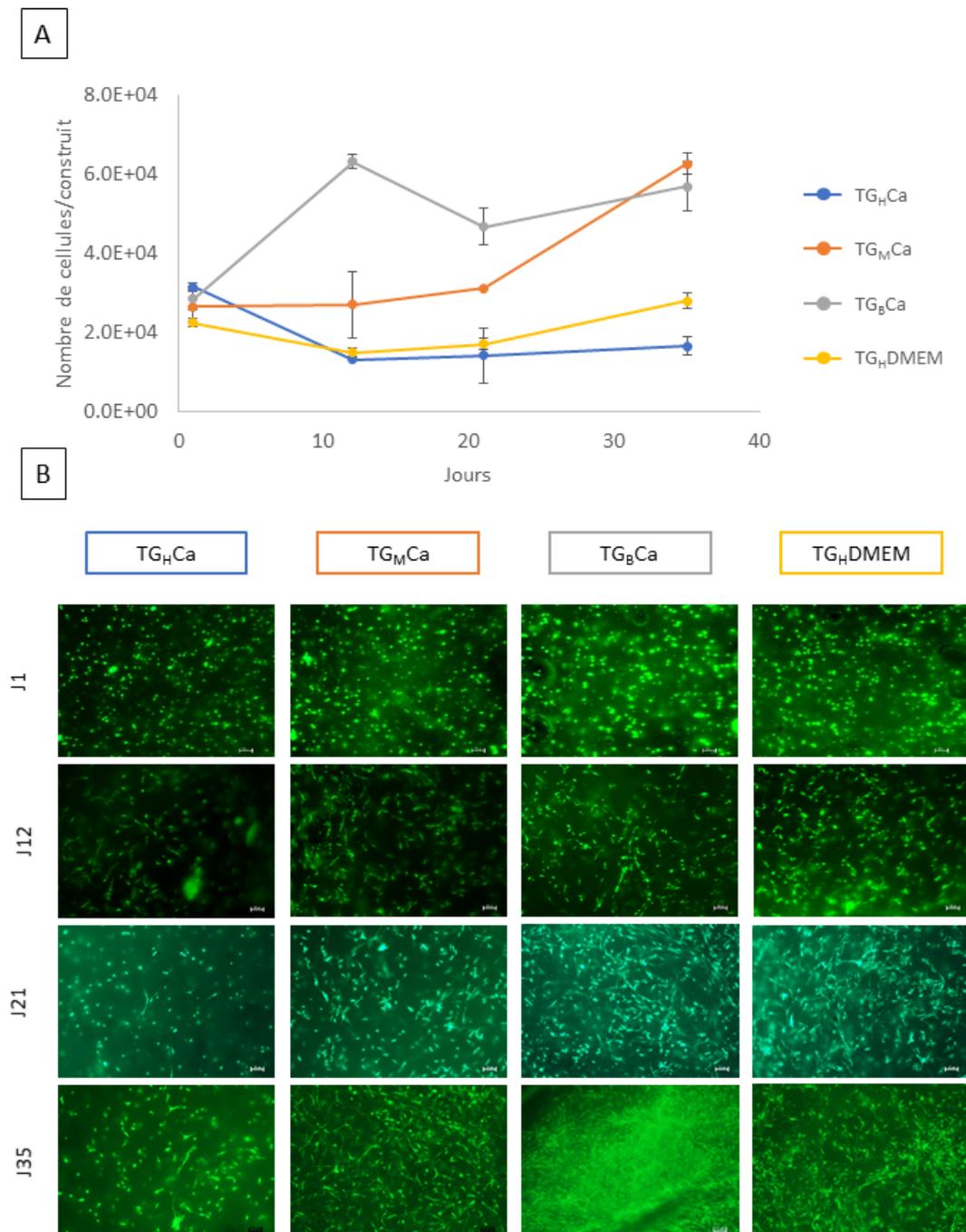


FIGURE 4.11 – Cinétique de prolifération et de la répartition des cellules dans les construits. A : Evolution du nombre de cellules par construit au cours de la maturation. B : images prises au microscope des cellules marquées en calcéine AM verte et observées avec un filtre à 475nm (objectif 4X). Barre d'échelle : 200 μ m. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium, TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

4.3.2.2 Remodelage de la matrice extracellulaire

Le remodelage de l'hydrogel par les ostéoblastes est évalué d'une part par leur capacité à contracter les hydrogels, et d'autre part par la sécrétion de matrice extracellulaire.

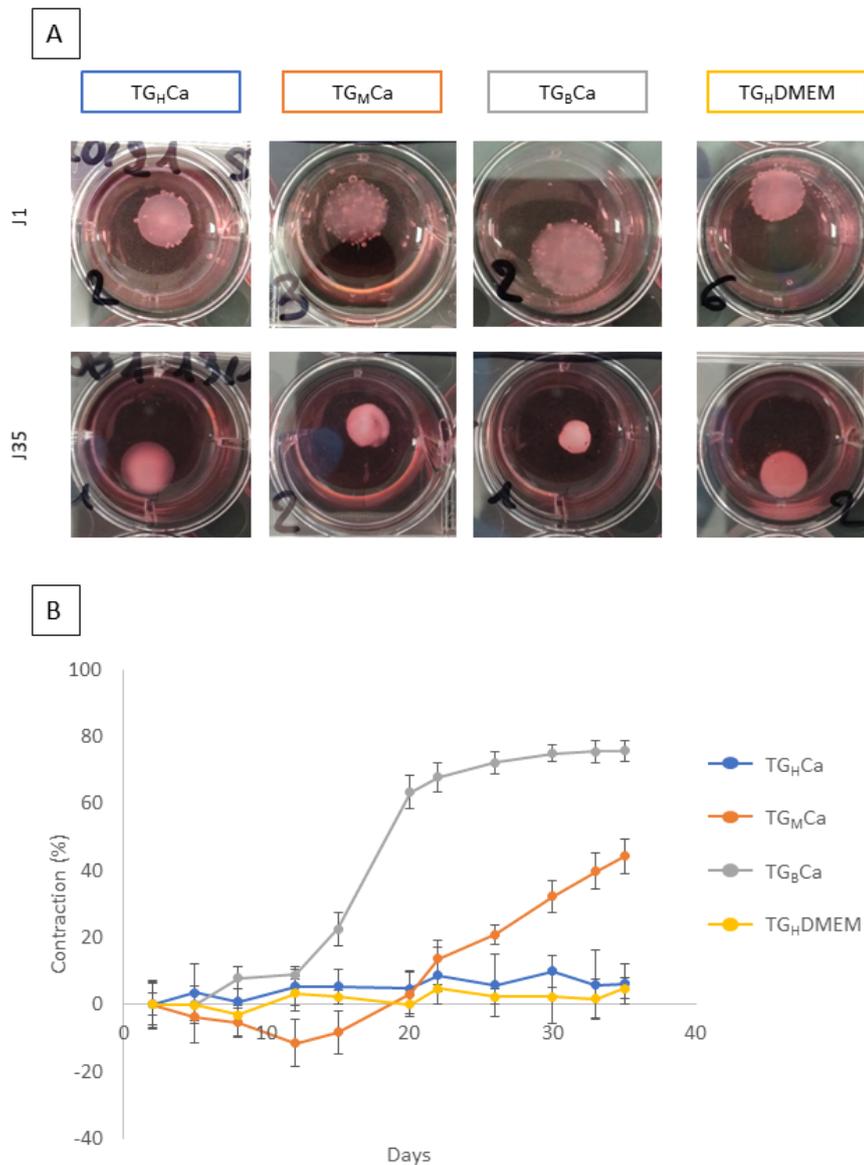


FIGURE 4.12 – Cinétique de contraction des construits au cours de la maturation. A : Aspect macroscopique des gels 1 jour et 35 jours après l'impression dans les puits de plaque 12 puits. B : Suivi temporel de la contraction des construits. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium, TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

La première observation de l'impact des propriétés mécaniques sur le remodelage de la matrice artificielle initiale par les cellules concerne l'aspect macroscopique des construits (figure 4.12). Après 35 jours de maturation, une contraction significative des construits viscoélastiques TG_MCa et TG_BCa est observable. A l'inverse, la contraction

dans les deux conditions élastiques (TG_HCa et TG_HDMEM) est négligeable compte tenu de la dispersion des données. Comme pour la cinétique de prolifération, la contraction des construits TG_BCa démarre plus tôt que celle des construits TG_MCa . En effet, la contraction des construits TG_BCa se produit entre J12 et J20 jour alors que celle des construits TG_MCa démarre seulement après 20 jours de culture. La contraction de tous les hydrogels acellulaires est restée négligeable tout au long de la culture. L'action des cellules est donc bien responsable de la contraction des construits.

La contraction des construits augmente la densité cellulaire et rapprochent les cellules les unes des autres. Ainsi, même si le nombre de cellules atteint est identique, la densité cellulaire des construits TG_BCa est supérieure à celle des construits TG_MCa en fin de culture. Certaines études ont provoqué cette contraction en appliquant une charge mécanique sur des hydrogels de collagène afin d'augmenter la densité en collagène et en cellules [280]. En effet, en augmentant la densité cellulaire, la communication entre les cellules est favorisée, ce qui pourrait participer à une meilleure différenciation.

Une étude avec des cellules de souris à différents stades de différenciation (de la cellule souche mésenchymateuse jusqu'au stade pré-ostéocytes) a montré que plus les cellules étaient engagées dans la différenciation ostéogénique, plus l'intensité des forces de contraction qu'elles génèrent était élevée. [288]. Ces forces de contraction générées par les cellules modifient à leur tour leur environnement. Dans les matériaux non dégradables avec un comportement purement élastique, comme c'est le cas pour les construits TG_HCa et TG_HDMEM (chapitre 3 section 3.2.2), il n'y a pas de relaxation des forces et la matrice qui entoure les cellules n'est pas remodelée. En revanche, dans les matériaux dont le comportement est de type viscoélastique, comme c'est le cas pour les construits TG_MCa et TG_BCa , la relaxation provoque un réarrangement de la matrice autour des cellules. Ce réarrangement entraîne à son tour un changement dans la liaison entre les cellules et leur matrice, ce qui influe sur leur capacité à se différencier [257, 293]. Cela donne donc un premier élément en faveur d'une différenciation plus marquée des cellules dans la condition TG_BCa .

Le remodelage de la matrice par les cellules a également été évaluée par la détection de la sécrétion de fibronectine et de collagène I.

Dans notre étude, la détection de la sécrétion de fibronectine par les ostéoblastes est évaluée en mesurant le pourcentage de surface de coupe histologique marqué par immunohistochimie (Fig 4.13-A et B). Après 5 jours de culture, la condition TG_BCa commence à se distinguer des autres avec un pourcentage de surface marqué environ trois fois plus important que pour les autres conditions. Après 12 jours de culture, la condition TG_BCa présente la plus grande surface marquée ($5,7 \pm 2,7 \%$), suivi par les conditions TG_MCa ($2,8 \pm 0,5 \%$) et TG_HDMEM ($3,3 \pm 1,8 \%$). Enfin, la plus faible expression est dans la condition TG_HCaCa avec seulement $1,0 \pm 0,2 \%$, soit près de six fois moins que la condition TG_BCa .

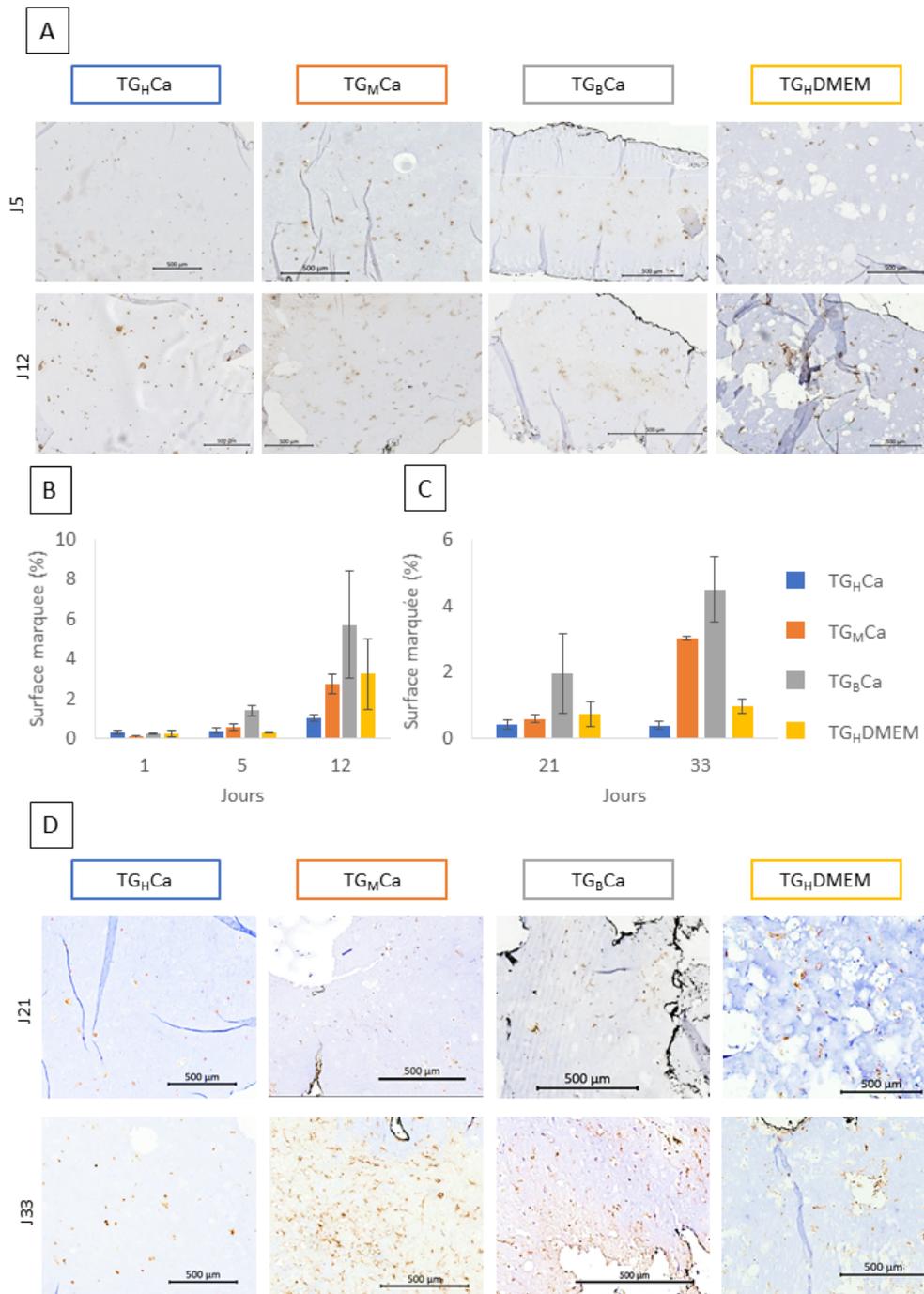


FIGURE 4.13 – Sécrétion de matrice organique par les ostéoblastes primaires. A : marquage de la fibronectine. La fibronectine est visualisée en marron et les noyaux des cellules en bleu. B : Quantification du pourcentage de surface marquée pour la fibronectine. C : Quantification du pourcentage de surface marquée par le collagène I. D : marquage du collagène I. Le collagène est visualisé en marron et les noyaux des cellules en bleu. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium, TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM. Barre d'échelle 500µm.

Malgré les différences de pourcentage de surface marquée, après 12 jours de culture, les cellules de toutes les conditions montrent un marquage péri-cellulaire, signe que l'attachement cellules-matrice a bien eu lieu et que les étapes précoces de la différenciation cellulaire ont bien été initiées dans toutes les conditions.

La sécrétion de collagène par les ostéoblastes intervient plus tard dans leur développement (Fig 4.1). Nous avons donc choisi de l'évaluer uniquement à partir de 21 jours. L'expression du collagène de type I a été analysée par un marquage immunohistochimique de la même manière que pour celle de la fibronectine.

Après 21 jours de culture, la production de collagène apparaît de manière très localisée autour des cellules. Néanmoins, la condition TG_BCa se distingue des autres par son niveau d'expression plus élevée. Le plus faible taux d'expression est encore une fois attribué à la condition TG_HCa avec $0,4 \pm 0,1$ %. C'est la seule condition qui ne montre aucune augmentation de l'expression du collagène I au cours de la culture.

Après 33 jours de culture, les tendances observées sont similaires à celles observées pour l'expression de la fibronectine. La plus grande surface marquée est obtenue pour les construits TG_BCa ($4,5 \pm 1,0$ %), puis pour les construits TG_MCa ($3,0 \pm 0,1$ %) et TG_HDMEM ($1,0 \pm 0,2$ %).

En fin de culture, le nombre de cellules dans les construits avec TG_BCa et TG_MCa est identique et la production de collagène est malgré tout 1,5 fois plus importante dans la condition TG_BCa. Cela signifie que le taux de synthèse du collagène par cellules est plus élevé dans les construits TG_BCa que TG_MCa. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la contraction qui ont indiqué un remodelage plus élevé dans cette condition.

Les marquages immunohistochimiques de la matrice extracellulaire ont mis en évidence le remodelage de l'hydrogel initialensemencé par les ostéoblastes. Cela apparaît clairement et principalement pour la condition TG_BCa, et dans une moindre mesure pour les autres conditions. Les composants de la bio-encre ont progressivement été remplacés par une matrice extracellulaire contenant du collagène I.

Pour aller plus loin dans l'analyse du remodelage de l'environnement des ostéoblastes, nous avons caractérisé par microscopie électronique à transmission l'organisation moléculaire de ces fibres de collagènes sécrétées. En effet, l'organisation des fibres de collagène à l'échelle nanométrique est un aspect critique pour reproduire un modèle *in vitro* fidèle à l'*in vivo*. Les molécules de collagène s'organisent de manière à former des fibres de collagène avec une périodicité de 67 nm *in vivo*.

Dans notre cas, des fibres striées, caractéristiques du collagène, avec une périodicité d'environ 90nm, sont observables dans toutes les conditions. Certains travaux rapportent la présence de fibres de collagène à espacement long, ayant ce type de périodicité, *in vivo* dans des tissus sains et pathologiques [267, 294], mais aussi *in vitro* dans certaines

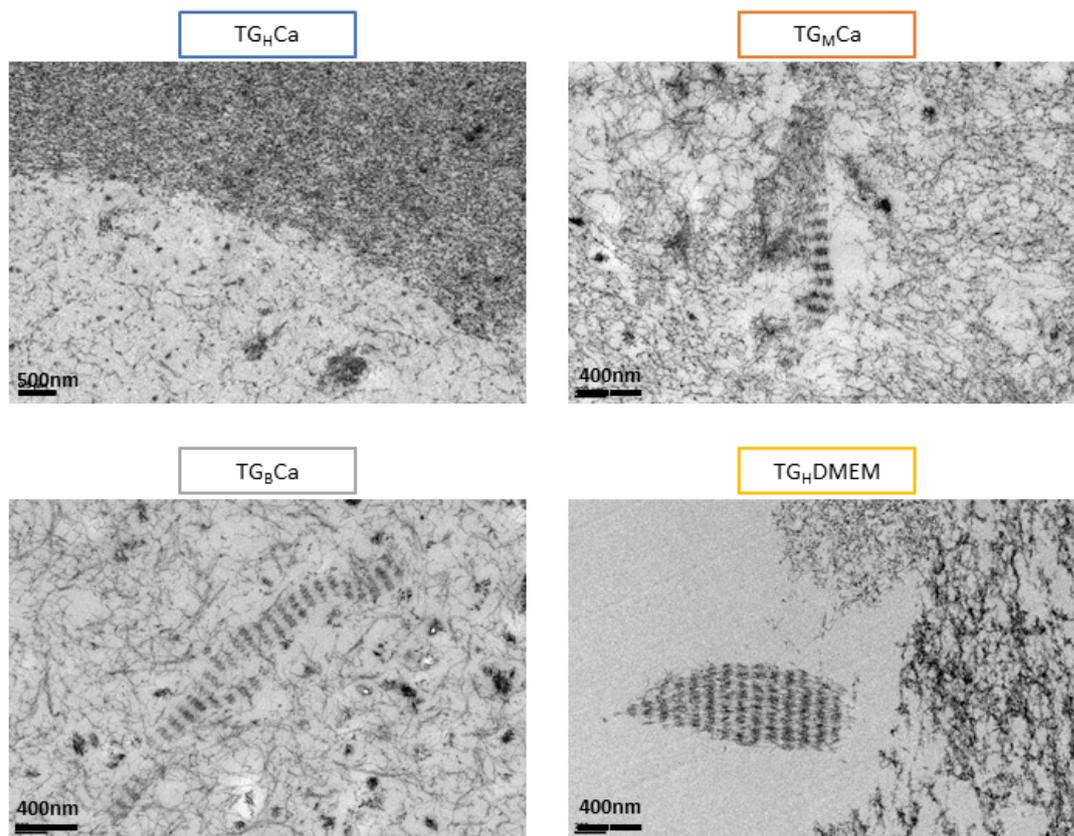


FIGURE 4.14 – Observation de la matrice par microscopie électronique à transmission. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium, TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

conditions de précipitation du collagène en solution [295-297]. Les auteurs de ces travaux ont émis deux hypothèses pour expliquer la présence de ce type de fibres dans leurs tissus. La première explique la désorganisation des fibres de collagène existantes par l'activité élevée de la collagénase endogène [298, 299]. La deuxième hypothèse est l'incorporation de constituants qui viendraient perturber la bonne organisation des molécules de collagène pendant la création des fibrilles [296, 297, 300]. Dans notre cas, l'hypothèse la plus probable est que des composants de l'hydrogel interfèrent avec le collagène durant son organisation et provoquent la formation de fibres de collagène avec un espacement supérieur à 67 nm. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre l'origine des fibres de collagène à espacement long dans notre modèle et optimiser les conditions de culture pour obtenir la périodicité attendue.

La présence de collagène à espacement long dans la matrice et l'absence d'un motif régulier d'organisation des fibrilles entre elles suggèrent que la matrice sécrétée par les cellules est similaire à de l'os tissé non organisé qui précède l'os lamellaire retrouvé dans les tissus plus matures [301]. Lors de la réparation de fractures, les ostéoblastes remplacent la matrice préliminaire de fibro-cartilage par de l'os tissé [302]. Dans notre

cas, les ostéoblastes remplacent la matrice artificielle initiale par de la matrice osseuse riche en collagène I. Il y a donc un parallèle entre la réparation de fracture *in vivo*, et le développement de matrice osseuse dans les construits bio-imprimés. Pour reproduire la matrice osseuse observée *in vivo*, il manque l'étape d'organisation des fibres de collagène de manière ordonnée [95]. *In vivo*, lors de la réparation de fracture, cette étape est assurée par la résorption de l'os tissé par les ostéoclastes et le dépôt d'une nouvelle matrice organisée par les ostéoblastes [302]. Il est difficile de conclure étant donné qu'à ce jour peu d'études *in vitro* se sont intéressées à la structure nanométrique de la matrice extracellulaire [95].

4.3.2.3 Marqueurs de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes

Les sections précédentes ont prouvé que les cellules des conditions TG_BCa , et dans une moindre mesure TG_MCaCa , ont été capables de remodeler leur matrice. Il reste maintenant à corréliser ce remodelage avec l'état de différenciation des cellules. Trois facteurs ont été évalués pour estimer le niveau de différenciation atteint par les ostéoblastes dans les différentes conditions : l'activité métabolique des cellules, leur morphologie et leur expression du marqueur PHEX, spécifique des ostéocytes.

a) Marqueurs cellulaires

Pour identifier le début de la transition des ostéoblastes en ostéocytes, nous avons suivi le changement de morphologie des cellules. Nous avons donc visualisé la structure du cytoplasme des cellules soit grâce à un marquage intra-cytoplasmique des cellules en culture à la calcéine AM, soit par un marquage du cytosquelette d'actine dans les hydrogels fixés au paraformaldéhyde à la fin de la culture.

Les images en calcéine (figure 4.15-A) révèlent trois phases distinctes en termes de morphologie cellulaire. Durant les 5 premiers jours, les cellules ont montré une morphologie cuboïde caractéristique des ostéoblastes actifs non différenciés. Après 12 jours de culture, quelques cellules ont commencé à former des dendrites. Cette étape marque le début de l'acquisition d'une morphologie d'ostéocytes. Après 35 jours de culture, les cellules ont formé un réseau interconnecté via leurs dendrites, signe d'un stade d'ostéocytes [303]. Seule la condition TG_HCa , au comportement élastique et avec le module d'élasticité le plus élevé, ne permet pas d'observer cette différenciation. Dans cette condition, les cellules sont restées éparses et certaines n'ont pas adopté la morphologie caractéristique des ostéocytes.

Les images obtenues en fin de culture au microscope confocal après marquage des noyaux par DAPI et du cytosquelette par phalloïdine (figure 4.15-B) confirment les images en calcéine. Les cellules des construits TG_MCa et TG_BCa affichent une morphologie d'ostéocytes avec des dendrites qui s'étendent depuis le corps cellulaire. Une différence de densité du réseau cellulaire entre ces deux conditions est observée. Dans les construits TG_BCa , un réseau dense de cellules interconnectées s'est formé alors que dans les construits

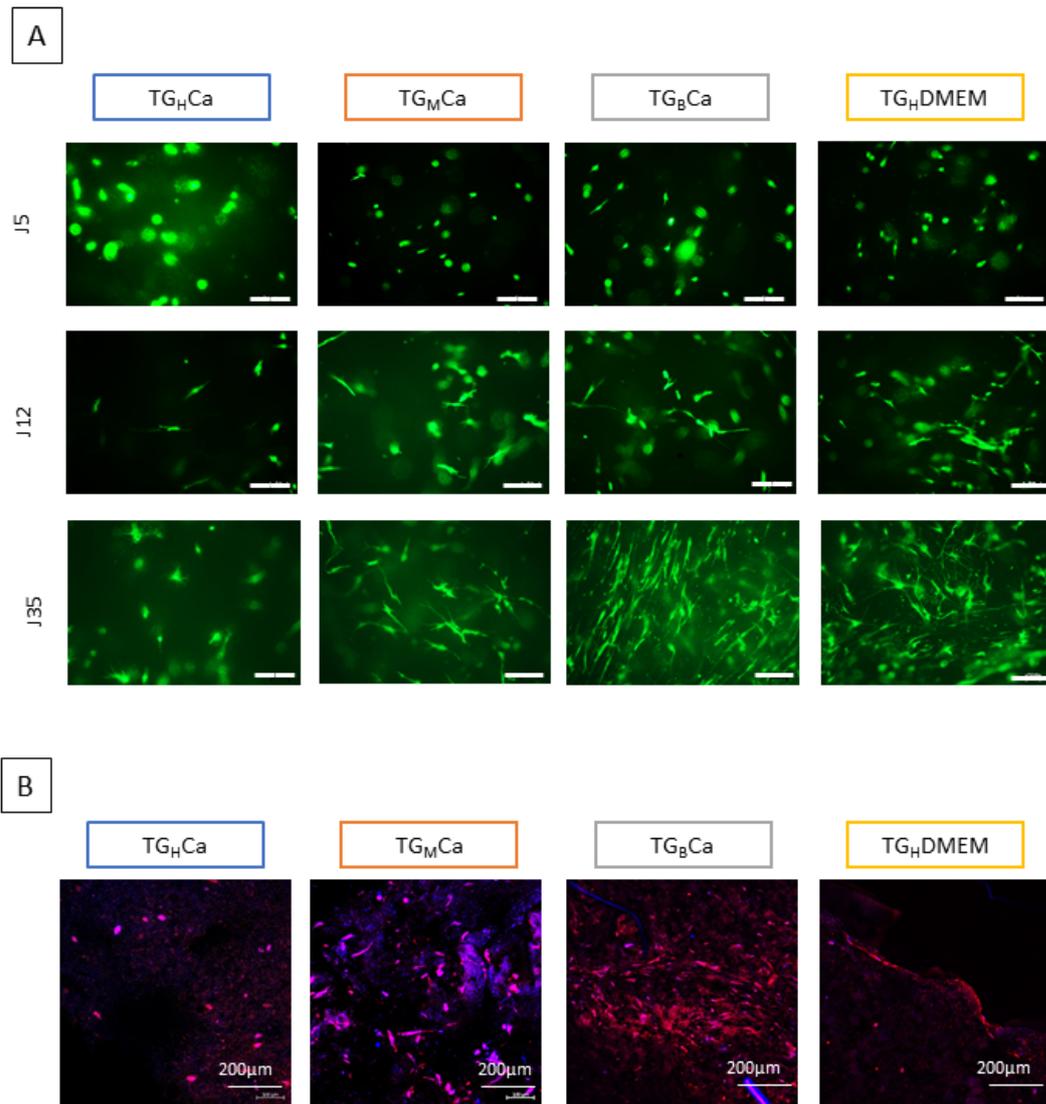


FIGURE 4.15 – Comparaison de la morphologie des cellules. A : images prises au microscope des cellules marquées en calcéine AM verte et observées avec un filtre à 475nm (objectif 10X). Barre d'échelle 100µm. B : marquage du cytosquelette d'actine par phalloïdine-Alexa fluor 546 (en rouge) et des noyaux par DAPI (en bleu). Les images sont la projection par intensité maximale des stacks obtenus au microscope confocal (objectif 10X). TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium, TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

TG_MCa, la densité de cellules est plus faible donc elles restent isolées les unes des autres. La morphologie cellulaire observée dans nos construits TG_BCa et TG_MCa est similaire à ce qui est observée dans la littérature pour des ostéocytes [87, 88, 106, 117]. Dans les construits TG_HDMEM, les cellules sont majoritairement en périphérie avec une morphologie très étirée. Cette morphologie est plutôt caractéristique de cellules bordantes, c'est-à-dire des ostéoblastes quiescents [38]. Comme décrit sur les observations en calcéine,

les construits TG_HCa présentent majoritairement des cellules cuboïdes, peu de cellules avec des dendrites sont visibles. Cela confirme une différenciation ralentie dans cette condition par rapport aux autres.

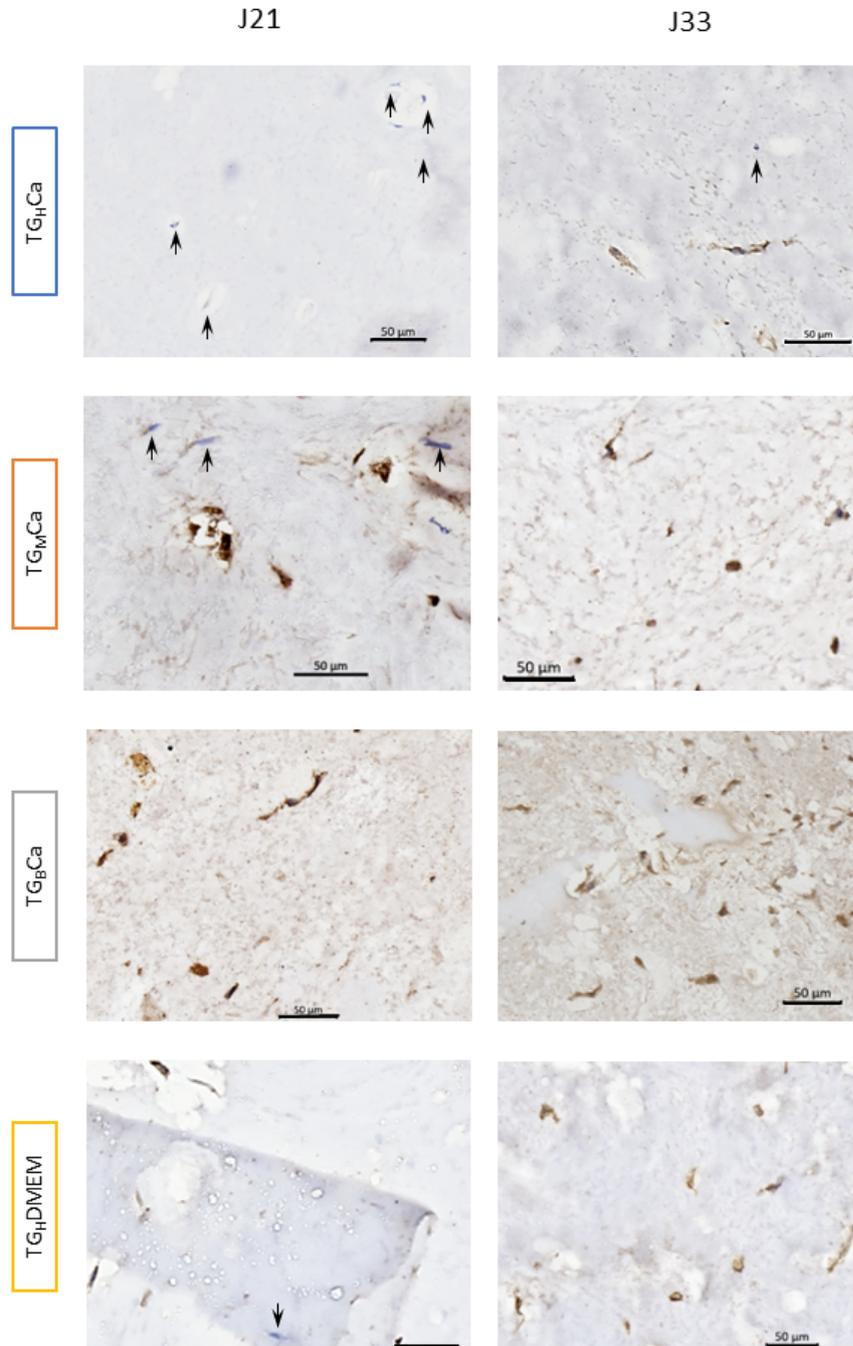


FIGURE 4.16 – Expression du marqueur PHEX spécifique des ostéocytes. Les cellules exprimant PHEX sont visualisées en marron après révélation par HRP et les noyaux sont visualisés en bleu par un contre marquage à l'hématoxylyne de Gill. Les flèches noires pointent les cellules négatives au marquage (cellules qui n'expriment pas PHEX). TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium, TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

Pour confirmer la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes, des coupes histologiques de nos construits ont été marquées avec un anticorps anti PHEX (phosphate regulating neutral endopeptidase on the chromosome X) (figure 4.16). Dès 21 jours de culture, les cellules des construits TG_BCa sont toutes positives. Dans les autres conditions, seulement quelques cellules sont marquées. En fin de culture, à part la condition TG_HCa qui montre encore quelques cellules non marquées, les trois autres conditions montrent un marquage positif de toutes les cellules visibles sur la coupe. Cela signifie que la différenciation est plus rapide dans les construits TG_BCa. Cependant, il est notable que toutes nos conditions de biofabrication permettent d'atteindre le stade ostéocytes.

Très peu de travaux dans la littérature utilisant des cellules primaires humaines dans un hydrogel se sont intéressées à la mise en évidence de la présence de marqueurs spécifiques d'ostéocytes. Le marqueur préférentiellement utilisé dans ce cas est DMP-1, qui est également un marqueur exprimé par les ostéocytes et impliqué dans la régulation du phosphate. Ainsi, Nasello *et al* [106] ont obtenu des cellules positives à DMP-1 à partir d'ostéoblastes primaires humains dans des hydrogels de collagène. Dans leur cas, ce marqueur est apparu après seulement 7 jours de culture pour une densité d'ensemencement de l'hydrogel très élevée (1.10^6 cellules/mL). La condition de faible densité (250 000 cellules/mL, soit une densité initiale similaire à la nôtre) n'a pas permis d'identifier de cellules différenciées même après 21 jours de culture. Bernhardt *et al* [87] ont observé un marquage de leurs cellules avec un anticorps anti DMP-1 également dans un hydrogel de collagène après 28 jours de culture. Cependant, dans ce cas, l'expression du gène de l'ALP a continué d'augmenter jusqu'à 28 jours de culture. Ceci a conduit les auteurs à conclure que la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes étaient incomplète, même après 4 semaines de maturation. Enfin, Thrivikraman *et al* [109] ont obtenu un marquage positif pour DMP-1 à partir de culture de cellules souches mésenchymateuses humaines dans un gel de collagène après 14 jours de culture.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude permet de créer les conditions de différenciation des ostéoblastes primaires humains en ostéocytes, à partir d'une faible concentration d'ensemencement dans des construits bio-imprimés.

b) Activité métabolique cellulaire

L'activité métabolique cellulaire a été identifiée comme marqueur de la différenciation des ostéoblastes. Nous avons donc choisi de l'évaluer grâce à différentes études complémentaires : premièrement par l'observation du contenu cytoplasmique des cellules, ensuite par la production journalière d'acide lactique qui est un marqueur du métabolisme carboné central des cellules en culture [304] et enfin par l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

Les images en microscopie électronique à transmission de nos construits dans les différentes conditions de polymérisation ont permis également d'observer le contenu cytoplasmique des cellules et d'identifier des marqueurs de l'activité cellulaire (figure

4.17-B). Ainsi, dans tous les construits, les cellules observées présentent de nombreuses vacuoles et mitochondries, signe d'une activité métabolique importante.

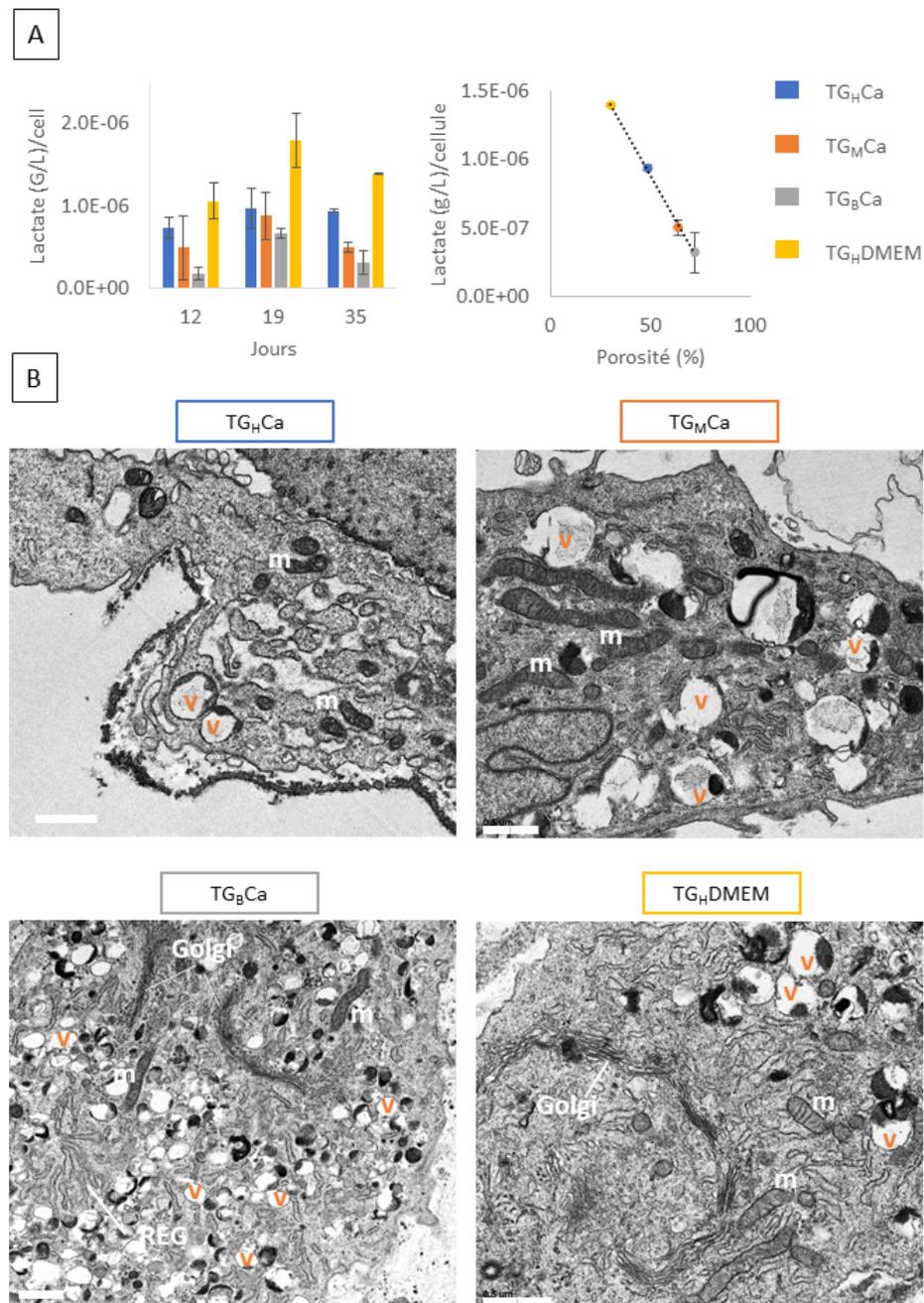


FIGURE 4.17 – Métabolisme des ostéoblastes primaires. A : production journalière de lactate normalisé par le nombre de cellules. B : contenu du cytoplasme des cellules observé par microscopie électronique à transmission. Barre d'échelle 1µm. m : mitochondrie, v : vacuole, REG : reticulum endoplasmique granuleux, Golgi : appareil de Golgi. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium, TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

La production journalière de lactate a été quantifiée dans les surnageants des cellules et normalisée par le nombre moyen de cellules dans les construits (figure 4.17-A). Pour

toutes les conditions, la cinétique de production du lactate suit la même tendance : une augmentation pour atteindre un maximum de production de lactate par cellules (*i.e* productivité spécifique) après 19 jours de culture, suivi d'une diminution pour revenir à un niveau équivalent à celui observée à 12 jours de culture.

La condition TG_HDMEM se distingue des autres par des valeurs de production de lactate 1,5 à 5 fois plus élevées que toutes les autres conditions sur toute la cinétique de culture. A l'inverse, la condition TG_BCa qui a montré la différenciation la plus rapide et une sécrétion plus importante de matrice extracellulaire, présente la production la plus faible. Ainsi, si toutes les conditions suivent le même schéma, la différenciation et la sécrétion de matrice sont plus élevées dans les construits où la production de lactate est la plus faible.

Nous observons une corrélation linéaire entre la production de lactate après 35 jours de culture et la micro-porosité des construits mesurée sur les images de microscopie électronique (coefficient de régression $R^2 = 0.99$). Il serait ici intéressant d'analyser plus finement le métabolisme comparé des ostéocytes et des ostéoblastes et notamment leur culture en condition aérobie ou anoxique, afin d'identifier si la qualité de l'hydrogel, et notamment sa microporosité, peut impacter l'accessibilité aux nutriments et à l'oxygène et induire des comportements métaboliques de cellules différenciées.

Les différences de métabolisme observées au cours du temps et entre les différentes conditions confirment que l'utilisation des tests métaboliques pour évaluer la prolifération cellulaire n'est pas adaptée et que des méthodes plus directes comme la quantification de l'ADN ou la numération cellulaire après dissociation des construits sont plus pertinentes.

Peu d'informations sont disponibles sur le métabolisme de l'acide lactique des ostéoblastes et des ostéocytes. Néanmoins, de récentes études sur des ostéoblastes primaires murins cultivées en 2D ont révélé un doublement de la production de lactate au cours de la différenciation [304, 305]. Ces études se sont limitées à une observation sur sept jours de différenciation. Il n'est donc pas possible de comparer notre tendance incluant une diminution sur des temps plus longs.

c) Activité de la phosphatase alcaline

L'expression de la phosphatase alcaline (ALP) est considérée comme un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique. Elle augmente au début de la différenciation puis revient à un niveau basal dans les ostéocytes [17]. Pour pouvoir comparer l'activité intracellulaire de l'ALP entre nos différentes conditions, les résultats (exprimés en mol de p-nitrophenol) ont été normalisés par le nombre de cellules dans chaque échantillon (fig 4.18).

Les cellules des construits TG_HCa et TG_MCa expriment un niveau d'ALP relativement stable au cours de la culture. L'absence de pic d'activité de l'ALP dans les construits TG_MCa est étonnante car ces construits ont montré un remodelage de la matrice. Dans la

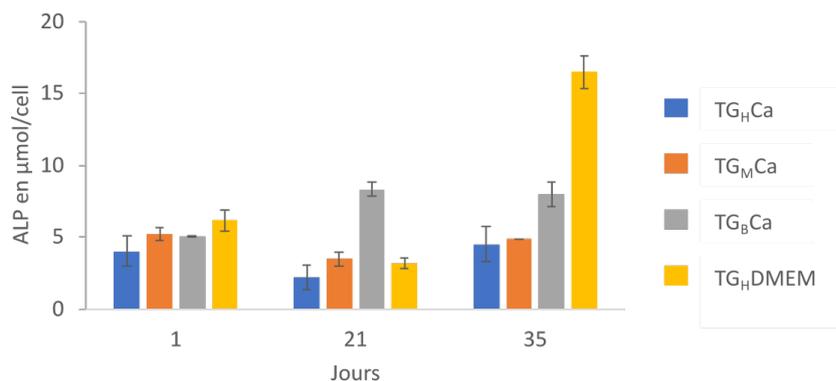


FIGURE 4.18 – Activité de l’ALP intracellulaire exprimée en μmol de p-NPP et normalisée par le nombre de cellules. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_MCa : concentration moyenne en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium, TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

littérature, ce remodelage survient après le pic d’activité de l’ALP [17]. Il est envisageable que les points de mesure soient trop espacés pour identifier ce pic d’expression.

En revanche, l’activité de l’ALP des construits TG_BCa et TG_HDMEM évolue dans le temps. La condition TG_BCa montre une augmentation de 63 % sur les 21 premiers jours puis se stabilise jusqu’à la fin de la culture. Il est notable que, dans ce cas, l’augmentation de l’activité de l’ALP, signe d’une différenciation active des cellules, coïncide avec la fin de la phase de prolifération. Cette observation concorde avec les observations réalisées *in vivo* [17]. En revanche, l’activité de l’ALP de la condition TG_HDMEM n’est pas liée à la prolifération cellulaire. En effet, elle diminue légèrement sur les 21 premiers jours puis atteint une activité 2,7 fois plus élevée à la fin de la culture qu’au premier jour alors que le nombre de cellules est resté stable au cours de la culture.

L’expression de l’ALP est évaluée de différentes manières dans la littérature. Certaines études quantifient l’activité de l’enzyme intracellulaire après lyse des cellules [117, 118], alors que d’autres la dosent dans les surnageants de culture [105, 106]. Certaines études révèlent la présence de l’enzyme par marquage histologique [113, 125], alors que d’autres ne s’intéressent qu’à l’expression de l’ARN par les cellules [87]. L’utilisation de ces différentes techniques rendent difficiles les comparaisons. L’un des principaux obstacles tient à l’absence de normalisation par la quantité de cellules présentes dans les hydrogels (nombre de cellules ou quantité d’ADN).

L’étude de Nasello *et al* [106] a également montré que la cinétique d’expression de l’ALP dépendait à la fois de la densité cellulaire et de l’origine des cellules (variabilité inter donneurs). Seule une condition présentant trois fois plus de cellulesensemencées que la densité utilisée dans notre cas ($1 \cdot 10^6$ cellules/mL *versus* $0,3 \cdot 10^6$ cellules/mL) a permis d’observer une hausse de l’activité de l’ALP. Dans ce cas, le pic de l’activité de l’ALP a été observé après environ 7 jours de culture, ce qui est très précoce par rapport à nos résultats. La densité cellulaire de $0,25 \cdot 10^6$ cellules/mL, équivalente à nos conditions,

n'a pas permis d'observer de variations de l'activité de l'ALP.

Bien que différentes études dans la littérature aient évalué l'activité de l'ALP à un seul point [113, 118, 125], c'est bien la cinétique d'expression de cette enzyme qui permet de renseigner sur le stade de différenciation des ostéoblastes. Ainsi, les travaux de Zhang *et al* [117] ont permis d'identifier un impact de l'hydrogel sur le pic d'activité de l'ALP dans les cellules stromales mésenchymateuses. L'augmentation de la concentration en alginate dans l'hydrogel, et donc de la rigidité, a déplacé le pic d'activité de 28 à 42 jours de culture. Par analogie, nous pouvons affirmer que ces résultats sont comparables avec ceux que nous avons obtenus pour les conditions TG_BCa et TG_HDMEM respectivement.

En conclusion, nous avons réussi à moduler le comportement de différenciation d'ostéoblastes primaires par leur encapsulation par bio-impression dans des hydrogel de micro-porosité et de rigidité différentes. Ceci nous a permis d'identifier une condition de bio-fabrication, la condition TG_BCa, qui reproduit donc toutes les étapes de la différenciation en ostéocytes : une première phase avec une croissance cellulaire active puis arrêt de la prolifération, suivi par une deuxième phase d'augmentation de l'activité de l'ALP et de la production de lactate, une troisième phase avec l'apparition de dendrites et la formation d'un réseau de cellules interconnectées et enfin une dernière phase avec l'expression de PHEX dès 21 jours de culture. Cette dernière phase coïncide également avec un remodelage actif de la matrice, comme l'ont montré la contraction des construits et la sécrétion de collagène.

4.3.3 Discussion générale

Nos résultats ont montré pour la première fois une différenciation complète d'ostéoblastes en ostéocytes dans des construits bio-imprimés. Cette différenciation était accompagnée d'un remodelage de l'hydrogel, indiqué par la contraction des construits (80 % de leur surface) et la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène et la fibronectine. Ces résultats ont été obtenus dans la condition TG_BCa qui a le plus faible module d'élasticité (chapitre 3). Ce résultat peut sembler surprenant car il va à l'encontre de nombreux travaux scientifiques qui ont préférentiellement augmenté le module d'élasticité en modifiant les conditions de réticulation ou en ajoutant des matériaux pour renforcer l'hydrogel [105, 108, 113, 115, 118, 123, 125, 306]. Ces stratégies consistent à se rapprocher de la rigidité de l'os afin de fournir aux cellules un environnement mécanique similaire à celui *in vivo*. Dans ces travaux, les gammes de modules d'élasticité étudiés sont de quelques centaines de Pa à plus de 300 kPa. En effet, alors que l'os minéralisé a un module d'élasticité d'environ 20 GPa, la matrice de collagène nouvellement déposée a été évaluée à 27 ± 10 kPa [54]. Cette dernière valeur fait référence et reste encore bien souvent la cible à atteindre pour les hydrogels destinés aux modèles osseux *in vitro*. Cependant, ces résultats doivent être relativisés. En effet, l'épaisseur de la matrice sécrétée était de seulement 350 nm. Or, comme la matrice reposait sur un substrat

de verre plus rigide de plusieurs ordres de grandeur, il est fort probable qu'il ait contribué à augmenter les forces mesurées par l'AFM, et ait donc augmenté artificiellement le module d'élasticité mesuré. Il a en effet été montré que, dans le cas de matériaux fins et mous reposant sur un substrat plus rigide, le module d'élasticité mesuré pouvait être jusqu'à trois fois plus élevé que le module réel du matériau [307, 308] si aucune fonction de correction de cet effet du substrat n'était appliquée. Il est donc probable que la valeur moyenne de 27 kPa soit surestimée.

Dans notre cas, le module d'élasticité de la condition qui nous permet d'atteindre la meilleure différenciation est inférieure à 8 kPa (chapitre 3). A l'inverse, la condition avec un module d'élasticité équivalent à celui rapporté pour l'ostéoïde (30 kPa), donnait les moins bons résultats. Certaines études qui ont comparé des hydrogels avec des rigidités différentes ont également obtenu une meilleure différenciation des cellules dans les hydrogels avec les propriétés mécaniques les plus faibles. Ainsi, Zhang *et al* [117] ont obtenu une meilleure différenciation dans les hydrogels avec un module d'élasticité de 0,7 kPa que dans ceux avec un module d'élasticité de 5,4 kPa. Cette tendance se retrouve également dans les résultats de Duarte Campos *et al* [105] qui a obtenu une meilleure différenciation dans les hydrogels de 5 kPa que dans ceux de 38 kPa.

D'autres propriétés de l'hydrogel peuvent également influencer la différenciation des ostéoblastes. Trappman *et al* [309] ont par exemple démontré que le comportement des cellules était plus influencé par la taille des pores de leur hydrogel de polyacrylamide que par leur module d'élasticité. Ouyang *et al* [310] ont ainsi démontré qu'en introduisant une micro-porosité, l'activité métabolique des cellules était augmentée et la minéralisation était plus homogène. En effet, la porosité a un impact fort sur la diffusion de l'oxygène et des nutriments au sein des hydrogels alors qu'une diffusion réduite de l'oxygène au sein des scaffolds constitue un facteur de différenciation des ostéoblastes en ostéocytes [311]. Il existe donc un optimum à trouver pour permettre la diffusion des nutriments jusqu'au cœur des construits, tout en maintenant une hypoxie relative afin de stimuler la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes. Dans notre cas, la différenciation est plus rapide dans la condition TG_BCa qui a la porosité la plus élevée. Nos résultats rejoignent donc ceux publiés par Ouyang *et al* [310], bien que le diamètre des pores de leur étude soit un ordre de grandeur plus élevé que la nôtre.

La dégradabilité et le potentiel de remodelage des hydrogels est un autre critère à prendre en compte pour le développement de modèle 3D *in vitro*. En effet, l'extension de dendrites pendant la différenciation en ostéocytes requiert dans un premier temps la dégradation de la matrice entourant les cellules. Lorsque cette dégradation est empêchée, les étapes suivantes de différenciation des ostéoblastes en ostéocytes et de synthèse de matrice sont entravées. La dégradabilité peut être réduite soit en utilisant des hydrogels insensibles aux enzymes de dégradation sécrétées par les ostéoblastes, les métalloprotéinases matricielles (MMP), soit en inhibant la synthèse de ces MMP [27, 28, 280]. Des résultats similaires ont été observés lors de l'implantation d'hydrogels *in vivo* pour la

régénération osseuse. Ainsi, les matériaux qui se dégradent dans le temps conduisent à une néosynthèse de tissus osseux plus importante que les matériaux moins sensibles aux MMPs [312, 313]. Dans notre cas, l'action de la solution de réticulation contenant la transglutaminase, dont l'activité enzymatique réticule la gélatine par une liaison $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ en utilisant les chaînes latérales des résidus glutamine et lysine, réduit fortement la dégradabilité de l'hydrogel. En effet, la transglutaminase est utilisée pour stabiliser les structure bioimprimées et ainsi augmenter leur résistance à la dégradation protéolytique [263]. Cela explique donc les différences de différenciation et de synthèse de matrice observées dans nos construits, et notamment leur réduction lors de l'utilisation de concentrations en transglutaminase plus importantes.

La synthèse de collagène est considérée comme une étape qui précède la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes [17]. Dans nos modèles, l'expression du marqueur PHEX, caractéristique des ostéocytes, intervient en même temps, voire précède la synthèse du collagène. Cette caractéristique se retrouve dans la lignée de pré-ostéocytes IDG-SW3 qui est capable de sécréter une matrice collagénique tout en exprimant certains marqueurs spécifiques des ostéocytes [119, 120]. A l'inverse, l'étude d'Amler *et al* [125] a observé une sécrétion de collagène très faible au bout de 28 jours associée à une maturation incomplète des ostéoblastes en ostéocytes. Dans leur étude, l'ajout de PEGDA dans l'hydrogel pour limiter la contraction des construits par les cellules a réduit la formation de dendrites par les cellules. Ainsi, lorsque la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes est perturbée, la sécrétion de matrice est diminuée. Akiva *et al* [301] ont obtenu des cellules exprimant des marqueurs spécifiques des ostéocytes au sein d'une matrice de collagène minéralisée. Cependant la chronologie de l'expression des marqueurs n'est pas détaillée dans cette étude. La plupart des informations concernant la séquence d'expression des marqueurs de différenciation ont été obtenues lors de cultures en 2D. De plus peu d'études utilisant des cellules primaires dans des modèles 3D ont évalué la présence de ce type de marqueurs spécifiques des ostéocytes. Il est donc à ce stade, difficile de conclure sur les différences observées entre notre étude et la chronologie de la différenciation rapportée dans la littérature [17, 23]. Une évaluation plus systématique des différents marqueurs de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes permettrait de déterminer si les différences observées dans les séquences d'expression des protéines rapportées ici et celles observées en 2D sont des spécificités des modèles 3D utilisés ou bien si elles reflètent plus généralement une différence entre les cultures 2D et 3D.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons identifié et exploré trois paramètres clés pour la réalisation d'un modèle d'os *in vitro* : l'impact du procédé de bio-fabrication, la source de cellules et les propriétés mécaniques et structurales de l'hydrogel (figure 4.19).

Dans un premier temps, nous avons validé le procédé de bio-impression des ostéoblastes

primaires. En effet, malgré l'altération à court terme de la prolifération des ostéoblastes après bio-impression par rapport au moulage, il est possible après 35 jours de culture de reconstituer une densité cellulaire comparable à celle observée dans les construits moulés. De plus, la morphologie et la répartition des cellules au sein des construits ne sont pas impactées par le procédé de bio-fabrication.

Nous avons ensuite montré que, bien que les lignées d'ostéoblastes immortalisées soient plus simples à utiliser grâce à leurs capacités prolifératives supérieures aux cellules primaires, elles ne reproduisent pas les capacités de différenciation des cellules primaires. Si ces cellules restent pertinentes pour étudier la biocompatibilité des matériaux destinés à être implantés chez l'humain, elles ne sont pas adéquates pour l'établissement d'un modèle physiologique *in vitro*, d'autant qu'elles ne permettent pas de tenir compte de la variabilité inter donneurs.

Enfin, nous avons travaillé sur les qualités structurale et mécanique de l'hydrogel support afin d'évaluer leur impact sur l'obtention d'un modèle os *in vitro*. Nous avons donc ici choisi de travailler uniquement sur la réticulation des constituants qui confèrent à l'hydrogel ses propriétés biomécaniques, à savoir la gélatine et l'alginate. Pour cela, les construits ont été réticulés avec différentes concentrations de transglutaminase et de calcium. La condition TG_BCa (0,2 % de transglutaminase et 3 % de calcium) a été identifiée comme la plus performante en termes de différenciation des ostéoblastes en ostéocytes : la fin de la phase de prolifération a été suivie par une augmentation de l'activité de l'ALP, accompagnée par l'extension de dendrites et l'expression du marqueur PHEX. Associée à cette différenciation, une activité de remodelage de la matrice extracellulaire a été mise en évidence d'une part par la contraction de la matrice par les cellules, d'autre part par la sécrétion de collagène. Il s'agit donc, à notre connaissance, du premier modèle *in vitro* bio-imprimé d'une dimension de 150 mm³ présentant les populations cellulaires et les biomarqueurs d'un tissu osseux.

Cependant, malgré ces résultats prometteurs, le modèle que nous avons généré reproduit seulement la synthèse d'os tissé, observable *in vivo* dans le cas de réparation de fracture. Nous n'avons pas identifié le degré d'organisation de la matrice extracellulaire caractéristique de l'os lamellaire, qui présente des lamelles concentriques, composées de fibres de collagène parallèles entre elles [314]. Pour atteindre ce degré d'organisation de la matrice extracellulaire, nous proposons d'envisager deux stratégies complémentaires : d'une part appliquer des stimulations mécaniques pendant la maturation des construits afin de reproduire l'action des contraintes *in vivo*, d'autre part de reproduire le remodelage de l'os tissé qui se produit lors d'une dernière étape de la réparation des fractures. Pour ce faire, il s'agirait d'introduire des ostéoclastes au contact des construits. En effet, cette population cellulaire est responsable de la résorption osseuse préalable au dépôt d'une nouvelle matrice structurée, après la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes et la synthèse de la matrice collagénique [46].

Notre modèle est donc prometteur car l'utilisation de la bio-impression nous permettra

de faire varier la géométrie et la porosité des construits. Il est donc possible de créer des modèles d'os trabéculaires qui ne sont pas réalisables par moulage. En effet, la porosité (40 à 95 % [12]) et l'épaisseur des travées qui le composent (50 à 400 μm [7]) ne sont atteignables que par la bio-impression 3D.

L'objectif de ce chapitre est donc atteint, étant donné qu'il s'agissait d'obtenir un modèle de tissus osseux *in vitro* pour l'étude de l'ostéogenèse imparfaite. Ce modèle pourra également être utilisé pour l'étude d'autres pathologies telles que l'ostéoporose ou les tumeurs osseuses. De plus, l'ajout de cellules endothéliales, combiné à la bio-impression pourrait servir à développer un modèle d'ostéon comportant un canal central afin d'assurer la vascularisation du tissu et ainsi envisager de construire des modèles osseux de plusieurs cm^3 .

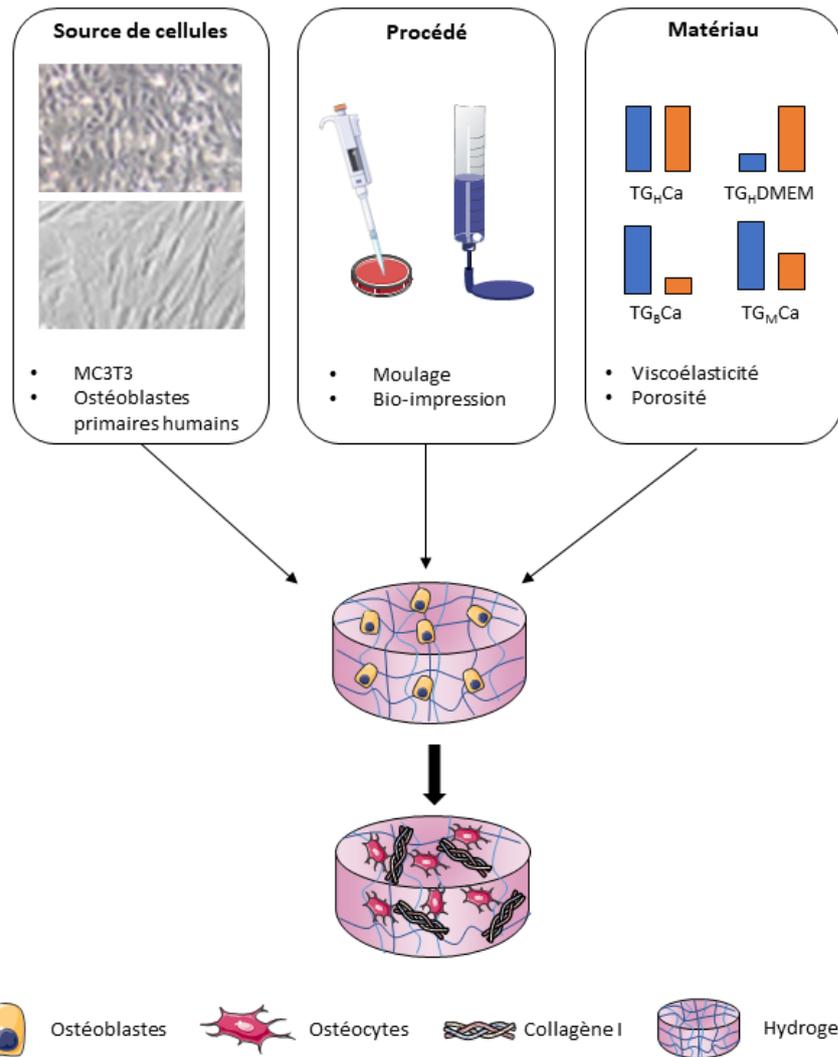


FIGURE 4.19 – Synthèse des paramètres explorés pour l'obtention d'un modèle de tissu osseux *in vitro* bio-imprimable

Chapitre 5

Influence des propriétés mécaniques des construit sur les modèles de derme *in vitro*

Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons déterminé les propriétés mécaniques optimales des construits bio-imprimés pour l'obtention d'un modèle *in vitro* de tissus osseux. Cependant, les propriétés mécaniques de la matrice sont spécifiques à chaque type cellulaire [315]. Dans ce chapitre, nous étudierons les conditions mécaniques qui favorisent l'obtention de modèles de derme *in vitro* (figure 5.1). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, il est ainsi possible d'étudier l'effet séparé du module d'élasticité et de la viscoélasticité sur le comportement des cellules. En effet, les conditions TG_HCa et TG_HDMEM confèrent la même élasticité mais des modules d'élasticité différents tandis que les conditions TG_BCa et TG_HDMEM confèrent le même module d'élasticité, mais ont des comportements viscoélastiques différents.

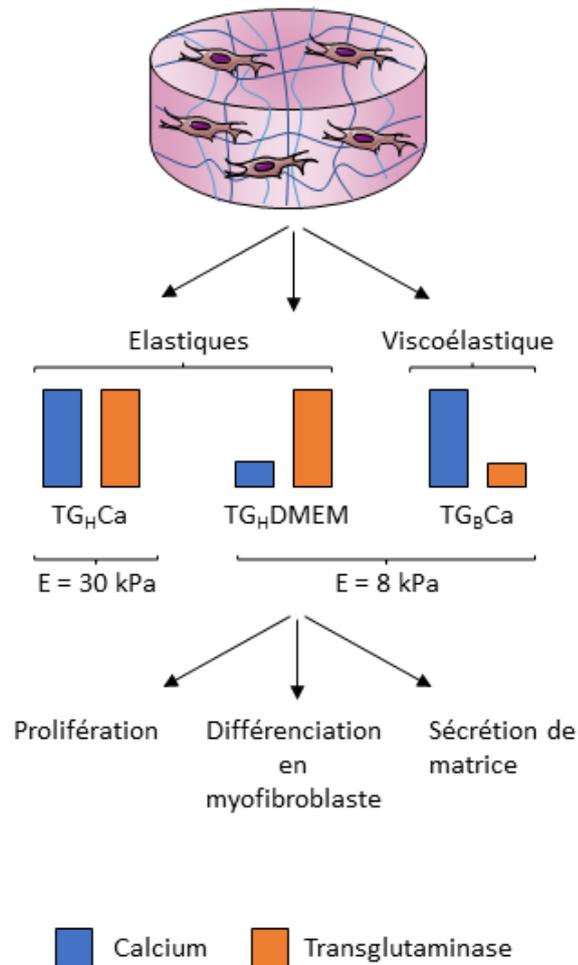


FIGURE 5.1 – Influence des propriétés mécaniques des construits sur les modèles de derme *in vitro*. Les construits bio-imprimés contenant les fibroblastes sont soumis à trois conditions de polymérisation différentes. Les conditions TG_HCa et TG_HDMEM confèrent la même élasticité mais des modules d'élasticité différents tandis que les conditions TG_BCa et TG_HDMEM confèrent le même module d'élasticité, mais ont des comportements viscoélastiques différents. L'effet des propriétés mécaniques sur le comportement des cellules est évalué par le suivi de la prolifération, la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la sécrétion de matrice.

5.1 Impact des solutions de réticulation sur la prolifération des fibroblastes

Une étude similaire à celle réalisée sur les ostéoblastes (chapitre 4 section 4.3.1) a permis de vérifier l'innocuité des solutions de réticulation sur les fibroblastes (figure 5.2). Une observation de la cinétique de prolifération durant 6 jours a permis d'identifier un très léger impact sur les fibroblastes de derme.

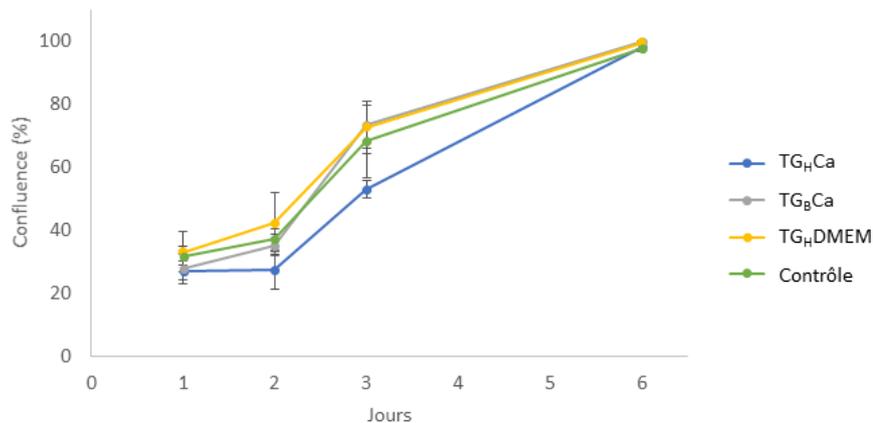


FIGURE 5.2 – Impact des solutions de réticulation sur les fibroblastes : suivi longitudinal de la confluence. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM, Contrôle : milieu de prolifération (DMEM) à la place des solutions de réticulation.

La cinétique de prolifération, obtenue par suivi de la confluence, montre un retard d'environ 24 h quand la solution est composée de 4 % de transglutaminase et de 3 % de CaCl₂ (condition TG_HCa) les 3 premiers jours par rapport aux autres conditions. Cependant, après 6 jours de culture, toutes les conditions affichent une confluence maximale. Il n'y a donc pas d'effet cytopathique des différentes solutions de réticulation utilisées sur les fibroblastes. Nous pouvons donc conclure que l'osmolalité des solutions de polymérisation et l'activité enzymatique de la transglutaminase n'ont pas d'effet sur la croissance des cellules lorsque le temps d'exposition est limité à 1 h.

5.2 Effets des propriétés mécaniques et structurales des construits sur le comportement des fibroblastes

L'effet des propriétés mécaniques et structurales des construits sur le comportement des fibroblastes a été évalué en termes de prolifération, de phénotype cellulaire et de sécrétion de matrice extracellulaire.

5.2.1 Prolifération et répartition des cellules

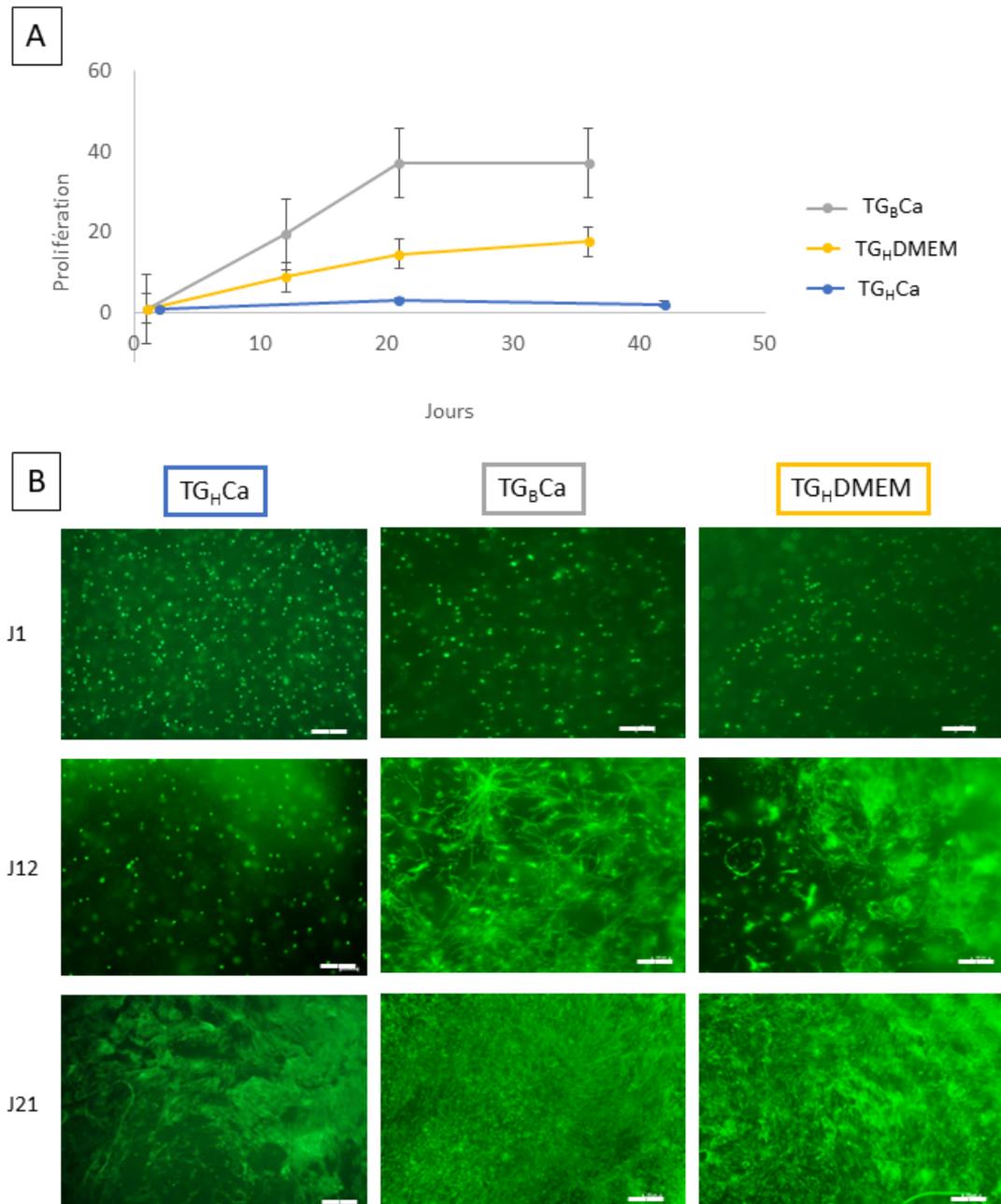


FIGURE 5.3 – Suivi de la prolifération et de la répartition des fibroblastes dans les construits. A : Evolution du nombre de cellules par construit au cours de la maturation. Les données ont été normalisées par le nombre de cellules à J1. B : images prises au microscope des cellules marquées en calcéine AM verte et observées avec un filtre à 475nm (objectif 4X). Barre d'échelle 200 μ m. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

La prolifération des fibroblastes a été quantifiée par numération des cellules au sein

des construits bio-imprimés (figure 5.3-A). Une tendance similaire composée de deux phases est observée dans toutes les conditions : une première phase de croissance pendant 21 jours puis une deuxième phase de stabilisation de la densité de cellules. Cependant, les densités de cellules atteintes ne sont pas les mêmes. La densité cellulaire la plus élevée est celle des construits TG_BCa : le nombre de cellules atteint après 21 jours de culture est respectivement 2,5 et 12 fois supérieur aux nombres de cellules des construits TG_HDMEM et TG_HCa.

Les observations microscopiques des cellules viables par marquage à la calcéine corroborent ces résultats (figure 5.3-B). Après 12 jours de culture, la différence de densité de cellules entre la condition TG_HCa et les autres conditions est visible. Dans toutes les conditions, à partir de 21 jours, les cellules ont formé une couche dense de cellules en surface des construits.

La répartition des cellules dans l'hydrogel a été analysée par les coupes histologiques (figure 5.4). Dans les construits de la condition TG_BCa, les cellules sont bien réparties dans le volume du gel. Cependant, dans les construits des conditions TG_HCa et TG_HDMEM, les cellules sont majoritairement en bordure sur une épaisseur de 10 à 20 μm , alors que l'intérieur est faiblement cellularisé.

Les propriétés mécaniques et structurales des construits ont un impact sur la prolifération et la répartition des fibroblastes. La densité de fibroblastes est plus élevée dans les construits TG_BCa. De plus, ces construits montrent également une répartition des cellules homogènes dans l'ensemble du volume alors que dans les construits TG_HDMEM et TG_HCa les cellules sont localisées principalement en périphérie.

5.2.2 Phénotype des fibroblastes

Les fibroblastes ont la capacité de se différencier en myofibroblastes. Ces cellules sont caractérisées par l'expression des fibres du cytosquelette α -SMA qui leur procurent des capacités de contraction de la matrice plus élevées que les fibroblastes. Les myofibroblastes ont une morphologie plus allongée [136, 174]. L'identification de l'apparition de ce phénotype chez les fibroblastes a donc été réalisée par l'observation de la morphologie des cellules, leur capacité à contracter les construits et par l'expression de la protéine α -SMA.

La morphologie cellulaire a été observée par marquage des cellules dans les construits à la calcéine (figure 5.5). Le suivi cinétique de la morphologie cellulaire a permis d'identifier des différences notables de morphologie et de vitesse d'organisation des cellules dans nos trois environnements. En effet, après 12 jours de culture, les cellules de la condition TG_BCa forment un réseau de cellules étirées connectées les unes aux autres. Dans la condition TG_HDMEM, les cellules adoptent une morphologie similaire mais sont plus éloignées les unes des autres. Au contraire, les cellules restent majoritairement rondes

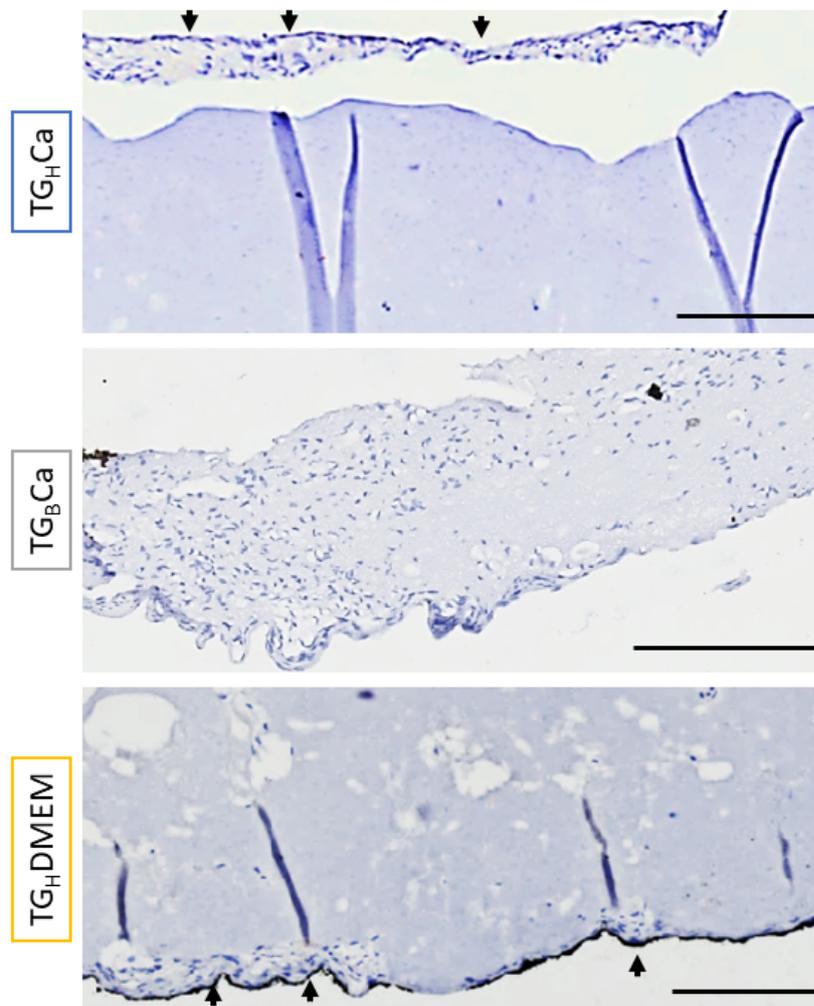


FIGURE 5.4 – Répartition des fibroblastes dans les construits après 33 jours de maturation. Les noyaux des cellules apparaissent en bleu foncé après marquage à l'hématoxyline de Gill. Les cellules sont réparties de manière homogène dans les construits TG_BCa alors qu'elles sont principalement sur les bords dans les construits TG_HCa et TG_HDMEM (flèches noires). Dans le construit TG_HCa , la couche superficielle de cellules s'est détachée lors de la coupe. Barre d'échelle $200\mu m$. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM

dans la condition TG_HCa . C'est après 21 jours de culture, alors que seules les cellules en surface des construits sont visibles, que l'on peut observer un réseau de cellules allongées et une morphologie identique pour toutes les conditions.

Ensuite, en ce qui concerne la capacité des fibroblastes à contracter leur matrice environnante, nous avons pu démontrer un effet de l'environnement biomécanique sur le comportement des fibroblastes (figure 5.6). La contraction des construits est linéaire pour les conditions TG_BCa et TG_HDMEM pendant les 35 jours de culture. Cependant, elle est deux fois plus importante pour la condition TG_BCa . Pour les construits de la condition TG_HCa , qui possèdent le module d'élasticité le plus élevé, la contraction se

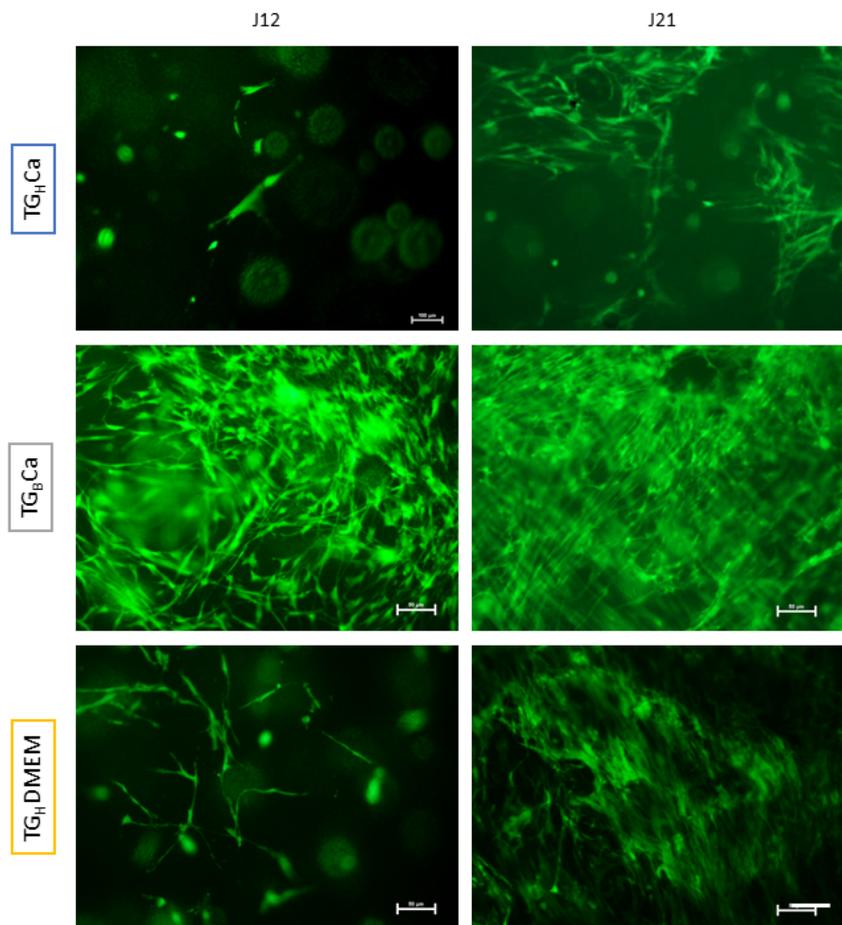


FIGURE 5.5 – Comparaison de la morphologie des fibroblastes. Images prises au microscope des cellules marquées en calcéine AM verte et observées avec un filtre à 475nm (objectif 10X). Barre d'échelle 50 μm . TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

produit seulement les 5 premiers jours puis se stabilise autour de 11 %, soit 4 fois moins que pour la condition TG_BCa . Aucune contraction n'a été visible en l'absence de cellules.

Ce comportement est confirmé par l'expression de la protéine α -SMA dans les trois conditions de culture (figure 5.7). Cette protéine est néosynthétisée par les myofibroblastes et n'est pas présente au démarrage des cultures. Après 33 jours de culture, toutes les cellules expriment les fibres du cytosquelette α -SMA associée à la contraction et ont une morphologie allongée caractéristique des myofibroblastes. Ainsi, ils semble que les différences de contraction des construits observées macroscopiquement sont liées d'une part à la répartition et à la quantité de cellules présentes dans les construits en fin de culture, et d'autre part, aux différences de propriétés mécaniques des construits. Ces deux effets ont déjà été décrits dans la littérature : plus la rigidité des construits augmente, plus la contraction diminue [316, 317], alors qu'une densité cellulaire plus élevée contribue à une plus grande contraction des construits [156, 285].

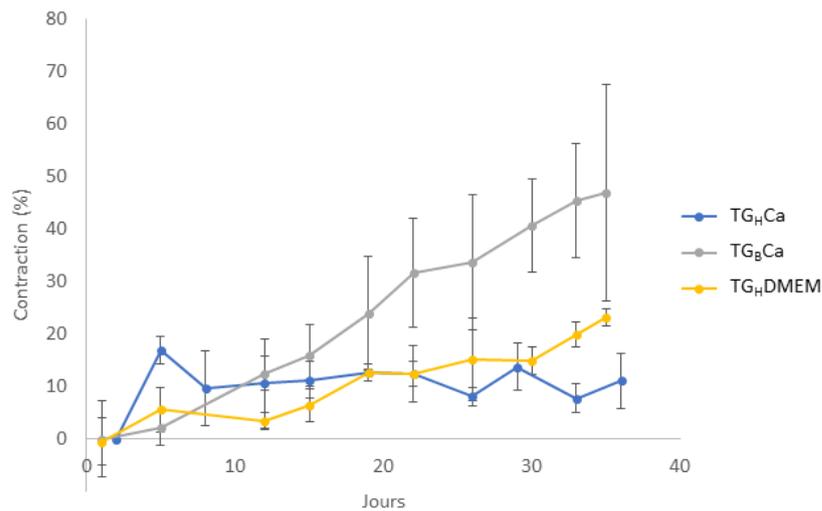


FIGURE 5.6 – Cinétique de contraction des construits. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

Les fibroblastes ont acquis un phénotype de myofibroblastes au cours des 33 jours de culture au sein de nos modèles. Cela a été vérifié par la morphologie allongée des cellules ainsi que par l'expression de la protéine du cytosquelette α -SMA. Les différences de contraction des construits sont imputées aux différences de propriétés mécaniques et à la plus grande densité de cellules présentes dans les construits TG_BCa.

5.2.3 Sécrétion de matrice extracellulaire par les fibroblastes

La physiologie des fibroblastes *in vivo* et *in vitro* se caractérise également par leur capacité à remodeler la matrice extracellulaire, notamment par la sécrétion de deux composants majeurs de celle-ci, la fibronectine et le collagène de type I. Comme dans le chapitre précédent, ces deux protéines ont été détectées par immunohistochimie (figure 5.8).

Nous observons que la fibronectine et le collagène sont localisés en périphérie des cellules. Dans les construits TG_BCa, où les cellules étaient réparties de manière homogène dans tout le volume (figure 5.4), l'expression du collagène I et de la fibronectine est observée sur toute la surface de la coupe. Au contraire, dans les construits TG_HCa et TG_HDMEM, où les cellules étaient situées principalement sur les pourtours, la sécrétion de collagène et de fibronectine se limite à la périphérie des construits. Cela est confirmé par la quantification des surfaces marquées par ces protéines qui montrent un marquage beaucoup plus étendu pour les construits TG_BCa.

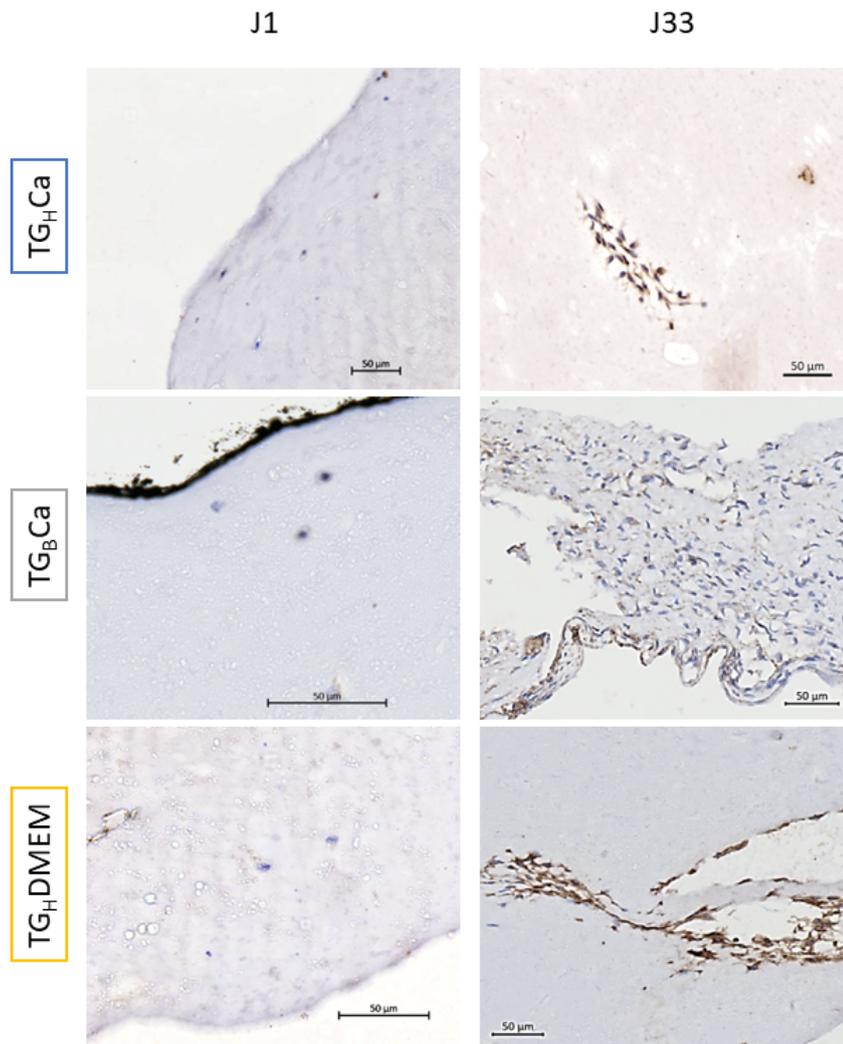


FIGURE 5.7 – Expression des fibres d' α -SMA dans les fibroblastes des construits après 33 jours de maturation. Images des coupes après marquage par immunohistochimie. Les cellules qui expriment les fibres d' α -SMA apparaissent en marron et les noyaux en bleu foncé. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

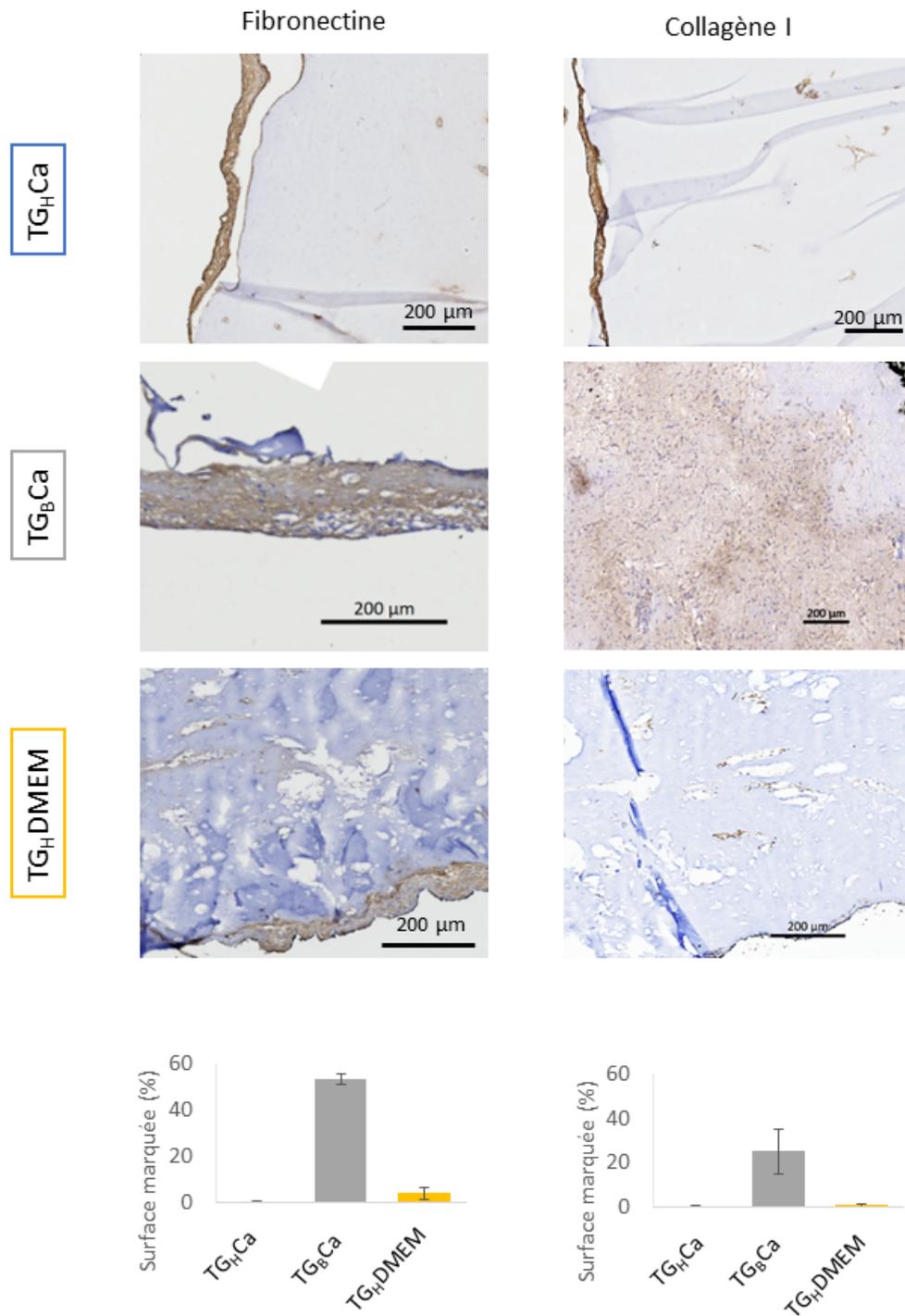


FIGURE 5.8 – Expression de la fibronectine et du collagène I dans les construits après 33 jours de maturation (marquage par immunohistochimie). La fibronectine et le collagène apparaissent en marron après révélation par la peroxydase et les noyaux des cellules apparaissent en bleu foncé. TG_HCa : concentration haute en transglutaminase et Calcium, TG_BCa : concentration basse en transglutaminase et Calcium TG_HDMEM : concentration haute en transglutaminase et DMEM.

L'expression du collagène I et de la fibronectine, détectées dans toutes les conditions, valide l'activité de remodelage des fibroblastes. Cette étude permet de mettre en évidence que seule la condition viscoélastique (TG_BCa) permet un remplacement significatif de l'hydrogel bio-imprimé par de la matrice néosynthétisée.

5.2.4 Discussion générale

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'impact de différents environnements biomécaniques et structuraux (chapitre 3) sur le comportement de fibroblastes de derme bio-imprimés. Les différentes caractéristiques biologiques que nous avons choisi de suivre, à savoir la capacité de prolifération des cellules dans les construits, le phénotype cellulaire et la capacité de remodelage de la matrice, sont importantes dans le cadre de notre étude des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire.

La prolifération des fibroblastes est fortement impactée par cet environnement biomécanique. Ainsi, l'augmentation du module d'élasticité et la réduction de la viscoélasticité du matériau ont directement réduit les capacités de prolifération des fibroblastes. Ceci induit la génération de modèles de tissu fortement hétérogènes avec une prolifération principalement en surface ou dans les pores des construits. Les effets de la rigidité des biomatériaux sur la prolifération des cellules ont été largement étudiés dans la littérature. Il est notable que les études présentées dans la littérature ne rapportent pas de tendance constante des comportements cellulaires vis-à-vis de la rigidité des biomatériaux utilisés. Ainsi, dans l'étude de Hadjipanayi *et al* [160], 3,4 fois plus de prolifération des fibroblastes a été observée dans les hydrogels de collagène de 143 kPa comparativement à ceux de 42 kPa. A l'inverse, l'étude de Shie *et al* [165] a montré un taux de prolifération près de 2 fois plus élevé dans les hydrogels de gélatine méthacrylée de 50 kPa comparés ceux de 139 kPa. Il est possible d'expliquer ces différences par les comportements viscoélastiques et élastiques des matériaux. En effet, le collagène possède un comportement viscoélastique, contrairement à la gélatine méthacrylée, ou dans notre cas, la gélatine réticulée par la transglutaminase qui ont un comportement élastique. Avec cet angle d'analyse, les résultats de la littérature corroborent nos résultats : la prolifération est maximale dans les construits au comportement viscoélastique.

Par ailleurs, il est important de prendre en compte la dégradabilité des hydrogels utilisés pour la culture des fibroblastes. En effet, il a été montré que la dégradation de la matrice par des métalloprotéinases (MMP) était essentielle à la migration, et donc à la prolifération des fibroblastes [318]. Dans notre cas, l'ajout de transglutaminase réduit fortement la dégradabilité de la gélatine par les MMP [263], il est donc probable que ce soit l'une des causes majeures des différences de prolifération entre les conditions de notre étude. C'est également l'hypothèse avancée par Shie *et al* [165] pour expliquer leurs résultats.

La transition des fibroblastes en myofibroblastes est une des étapes de la cicatrisation des plaies et a également été observée *in vitro* [174]. Nous avons pu observer une apparition retardée de la morphologie allongée caractéristique des myofibroblastes dans notre condition avec le module d'élasticité le plus élevé et un comportement élastique (TG_HCa). Ces résultats confirment l'étude de Branco Da Cunha *et al* [273] qui rapporte un ralentissement de l'acquisition d'une morphologie allongée lorsque le module d'élasticité de leur matériau augmente. Cette caractéristique semble être spécifique de la culture en 3D où les modes d'adhésion des cellules sont différents de ceux en 2D [319]. En effet, l'étude d'Ibañez *et al* [174], réalisée après ensemencement des fibroblastes en 2D sur les hydrogels formés au préalable, a montré un comportement inverse où la rigidité induit une élongation des cellules plus importante à 40 kPa qu'à 3 kPa.

Plusieurs études ont montré que l'expression de la protéine du cytosquelette α -SMA, considérée comme un marqueur des myofibroblastes, dépendait de la rigidité du substrat [136, 320]. En effet, lors de la cicatrisation, les fibroblastes dermiques colonisent la matrice provisoire très souple de fibrine. Lorsque les fibroblastes commencent à sécréter la nouvelle matrice et à induire la contraction des tissus, la rigidité de la matrice extracellulaire augmente. Cette étape correspond également à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes [321]. Ce phénomène de différenciation a également été observé *in vitro*. Les fibroblastes cultivés dans des hydrogels de collagène très souples conservent un phénotype quiescent [136]. En revanche, à partir d'un certain seuil de rigidité, ces cellules commencent à exprimer les fibres d' α -SMA. D'après les travaux de Goffin *et al* [322], ce seuil est d'environ 20 kPa sur des hydrogels de PDMS avec seulement 1 % des cellules qui exprimeraient α -SMA en dessous de 10 kPa. De façon similaire, les travaux d'Ibañez *et al* montre une expression partielle d' α -SMA à partir de 10 kPa. Parallèlement, une étude a montré qu'environ 30 à 40 % des fibroblastes extraits des zones de cicatrisation exprimaient α -SMA [323]. Il est donc remarquable que dans notre cas, au contraire des modules d'élasticité aussi faibles que 8 kPa suffisent déjà à induire l'expression des fibres d' α -SMA, et ce pour toutes les cellules présentes dans nos construits. Cependant, nos résultats sont issus de temps de culture beaucoup plus longs que ceux de la littérature pré-citée (33 jours contre 12h à 12 jours).

Au cours du phénomène de cicatrisation, une fois la plaie refermée, les myofibroblastes meurent par apoptose. Dans le derme sain, la densité de cellules est relativement faible et seulement 1 % des cellules expriment α -SMA [132, 136, 323]. Il semble donc que soit nos cellules n'ont pas atteint le stade de maturation nécessaire au déclenchement de l'apoptose, soit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes a été suractivée, ce qui est le cas lors de pathologie comme la fibrose [324].

Les analyses histologiques ont révélé que les fibroblastes de la condition TG_BCa ont remplacé la bio-encre qui procurait le support initial par leur propre matrice de collagène I et de fibronectine. En revanche, dans les deux autres conditions la synthèse de matrice a été limitée à la surface extérieure et dans les pores des construits. Les résultats de

sécrétion de collagène et de fibronectine pour les construits TG_BCa sont en accord avec les résultats de la littérature qui montrent un marquage superposé des deux composants [170, 325]. La fibronectine est déposée rapidement lors de la cicatrisation. Le collagène I est synthétisé plus tardivement et vient en remplacement d'une partie du collagène III. L'élastine est le dernier composant de la matrice à être sécrété [132, 326]. Pour compléter notre analyse, il serait donc intéressant de rajouter les analyses histologiques du collagène III et de l'élastine. Cela permettrait notamment de conclure sur le stade de maturation atteint par les construits.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons adapté un modèle existant de bio-impression de peau reconstruite [164] pour augmenter la rigidité du matériau tout en conservant la capacité proliférative des cellules. Pour cela, les construits ont été polymérisés avec des concentrations de calcium et de transglutaminase différentes. Cela nous a permis de séparer l'effet de la viscoélasticité et celui de la rigidité des construits sur le comportement des cellules après 33 jours de maturation.

Les construits de la condition TG_BCa ont montré une répartition homogène des cellules, contrairement aux deux autres conditions où les cellules étaient situées sur les bords extérieurs du gel où dans les pores. Toutes les conditions ont provoqué une activation de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes mais seule la condition TG_BCa a montré un remplacement de la bio-encre par une matrice homogène de fibronectine et de collagène I. Ce n'est donc pas le phénotype des cellules qui est en cause dans la différence de synthèse de matrice.

La condition TG_BCa reproduit partiellement ce qui est observé lors de la cicatrisation. La densité de cellules très élevée et stable après trois semaines de culture, couplée à un marquage positif de toutes les cellules pour les fibres d' α -SMA indique que soit la dernière phase d'apoptose et de remodelage de la matrice n'a pas encore été atteinte, soit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est suractivée. Pour trancher entre les deux hypothèses, il faudrait compléter les résultats avec des marquages α -SMA et des quantifications de cellules à des temps plus longs et compléter les analyses de la matrice avec des marquages de collagène III et d'élastine.

Comme les modules d'élasticité des conditions TG_BCa et TG_HDMEM sont équivalents, il semble que la viscoélasticité et la dégradabilité de la matrice par les MMP soient les critères principaux pour l'obtention d'un modèle permettant une synthèse importante de collagène I.

Enfin, le modèle pourrait être amélioré par l'ajout d'un épiderme et de vascularisation. En effet, les sécrétions de molécules par les différents types cellulaires participent à l'organisation de la matrice extracellulaire [327]. De plus, la formation d'un réseau

vasculaire au sein du derme fait partie de la cicatrisation et permet la diffusion de nutriments et d'oxygène. Cela pourrait donc contribuer à reproduire plus fidèlement la physiologie du derme *in vivo*.

Chapitre 6

Caractérisation mécanique des construits cellularisés

Introduction

Dans les chapitres 4 et 5, nous avons vu comment les propriétés mécaniques des construits influençaient le comportement des ostéoblastes et des fibroblastes. Nous allons à présent nous intéresser à l'action des cellules sur les construits et à leurs effets sur leurs caractéristiques mécaniques. Dans un premier temps, l'essai d'indentation permettra de caractériser les propriétés mécaniques des construits en lien avec la sécrétion de matrice par les cellules. Nous évaluerons ensuite l'intensité des forces de traction générées par les cellules à partir de l'aspect macroscopique des construits.

Les analyses se concentreront sur les construits TG_HDMEM et TG_BCa qui possèdent des modules d'élasticité équivalents mais un comportement viscoélastique différent.

6.1 Propriétés mécaniques des construits : essai d'indentation

Bien que le module d'élasticité des hydrogels soit généralement calculé par des essais de compression macroscopique ou par DMA, l'essai d'indentation possède de nombreux avantages. Il ne nécessite l'application d'aucune pré-contrainte sur l'échantillon avant la mesure et n'engendre pas sa destruction dans la gamme des efforts que nous utilisons. De plus, il donne accès au comportement mécanique local des échantillons, permettant ainsi d'évaluer leur hétérogénéité. Enfin, durant l'essai d'indentation, il est aisé de maintenir les échantillons hydratés, ce qui est important pour les hydrogels composés à 90 % d'eau. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons choisi cette méthode afin de mesurer les propriétés mécaniques des construits contenant les ostéoblastes ou les fibroblastes après 33 jours de

maturation.

6.1.1 Analyse des propriétés élastiques des construits

En première approximation, nous supposons que les construits ont un comportement principalement élastique.

6.1.1.1 Comparaison des méthodes de calcul du module d'élasticité

Le module d'élasticité des construits peut être calculé par la méthode d'Oliver et Pharr [328] à partir de la raideur de contact telle que présentée dans le chapitre 2. Cette méthode est valide pour des matériaux élastiques-plastiques. Dans notre cas, aucune déformation plastique résiduelle n'est observée sur nos construits. Il est donc possible d'appliquer en première approximation les équations de Hertz (valables pour les matériaux élastiques) qui relient la force et le déplacement tel que :

$$F = k\delta^n \quad (6.1)$$

où δ désigne l'enfoncement de l'indenteur dans l'échantillon et où k et n sont des constantes dépendant respectivement du matériau et de la géométrie de l'indenteur. Ainsi, pour un indenteur sphérique s'enfonçant dans un matériau plan élastique semi-infini, $n = 3/2$ et $k = 4/3E^*\sqrt{R}$, d'où :

$$F = \frac{4}{3}E^*\sqrt{R}\delta^{3/2} \quad (6.2)$$

avec R le rayon de courbure l'indenteur et E^* le module d'élasticité réduit défini par :

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_{ech}^2}{E_{ech}} + \frac{1 - \nu_{ind}^2}{E_{ind}} \quad (6.3)$$

où E_{ech} et E_{ind} désignent respectivement les modules d'élasticité de l'échantillon analysé et de l'indenteur, et ν_{ech} et ν_{ind} leurs coefficients de poisson.

Dans un premier temps, nous souhaitons vérifier que le comportement mécanique des construits est assimilable, en première approximation, à celui d'un matériau élastique. Pour cela, nous avons modélisé la loi de comportement théorique de la force en fonction du déplacement des construits à partir de l'équation 6.2 et en utilisant la relation $K_z = 2E^*a$:

$$F = \frac{4}{3} \frac{K_z}{2a} \sqrt{R} \delta^{3/2} \quad (6.4)$$

Les valeurs de a et K_z sont obtenus à partir des courbes expérimentales de force en fonction du déplacement. Le paramètre d'ajustement entre les courbes théoriques et

expérimentales est alors le facteur n , qui est directement lié au comportement élastique du matériau. Ainsi, pour un matériau élastique, $n = 3/2$ et plus la valeur de n s'éloigne de $3/2$, plus le matériau s'éloigne du comportement élastique. L'analyse est réalisée séparément sur la courbe de charge et de décharge des matériaux. Les résultats sont représentés dans les tableaux 6.1 et 6.2 pour les ostéoblastes et les fibroblastes.

Jours	Condition	n calculé sur la charge	n calculé sur la décharge
1	TG _H DMEM	$1,52 \pm 0,02$	$1,53 \pm 0,02$
	TG _B Ca	$1,53 \pm 0,02$	$1,53 \pm 0,02$
33	TG _H DMEM	$1,52 \pm 0,01$	$1,53 \pm 0,01$
	TG _B Ca	$1,61 \pm 0,01$	$1,64 \pm 0,01$

TABLE 6.1 – Valeurs de n obtenues à partir de l'équation 6.4 et de l'ajustement des données expérimentales de force en fonction du déplacement obtenues sur les construits avec les ostéoblastes. Les données sont présentées de la forme moyenne \pm écart-type.

Jours	Condition	n calculé sur la charge	n calculé sur la décharge
1	TG _H DMEM	$1,49 \pm 0,01$	$1,50 \pm 0,01$
	TG _B Ca	$1,51 \pm 0,01$	$1,51 \pm 0,01$
33	TG _H DMEM	$1,49 \pm 0,01$	$1,50 \pm 0,01$
	TG _B Ca	$1,55 \pm 0,01$	$1,57 \pm 0,01$

TABLE 6.2 – Valeurs de n obtenues à partir de l'équation 6.4 et de l'ajustement des données expérimentales de force en fonction du déplacement obtenues sur les construits avec les fibroblastes. Les données sont présentées de la forme moyenne \pm écart-type.

Les résultats suivent la même tendance pour les deux types cellulaires et confirment les observations réalisées sur les construits acellulaires (chapitre 3) : la condition TG_HDMEM conserve un comportement élastique après 33 jours de culture ($n = 3/2$) alors que la condition TG_BCa montre un comportement élastique le premier jour ($n = 3/2$) mais s'en éloigne après 33 jours de culture ($n > 3/2$). Cependant, cet écart reste faible (moins de 10 %), donc en première approximation, le comportement mécanique de TG_BCa peut être assimilé à celui d'un matériau élastique. En procédant par méthode inverse, en imposant $n = 3/2$ dans l'équation 6.2, il est alors possible de déduire les valeurs du module d'élasticité des construits à partir des données expérimentales de la force en fonction du déplacement. Les résultats sont ensuite comparés aux valeurs de module d'élasticité calculées à partir de la raideur de contact dans la figure 6.1.

Les tendances sont les mêmes pour les deux types cellulaires. Les trois modules d'élasticité calculés sont similaires lorsque l'hypothèse d'élasticité est vérifiée ($n = 3/2$). En revanche, pour TG_BCa après 33 jours de culture, les valeurs moyennes de module obtenues par le calcul de la raideur de contact sont surestimées par rapport aux valeurs de modules obtenues par l'équation 6.2. En effet, les modules calculés par la raideur de contact sont plus élevées de 150 % pour les fibroblastes et de plus de 200 % pour

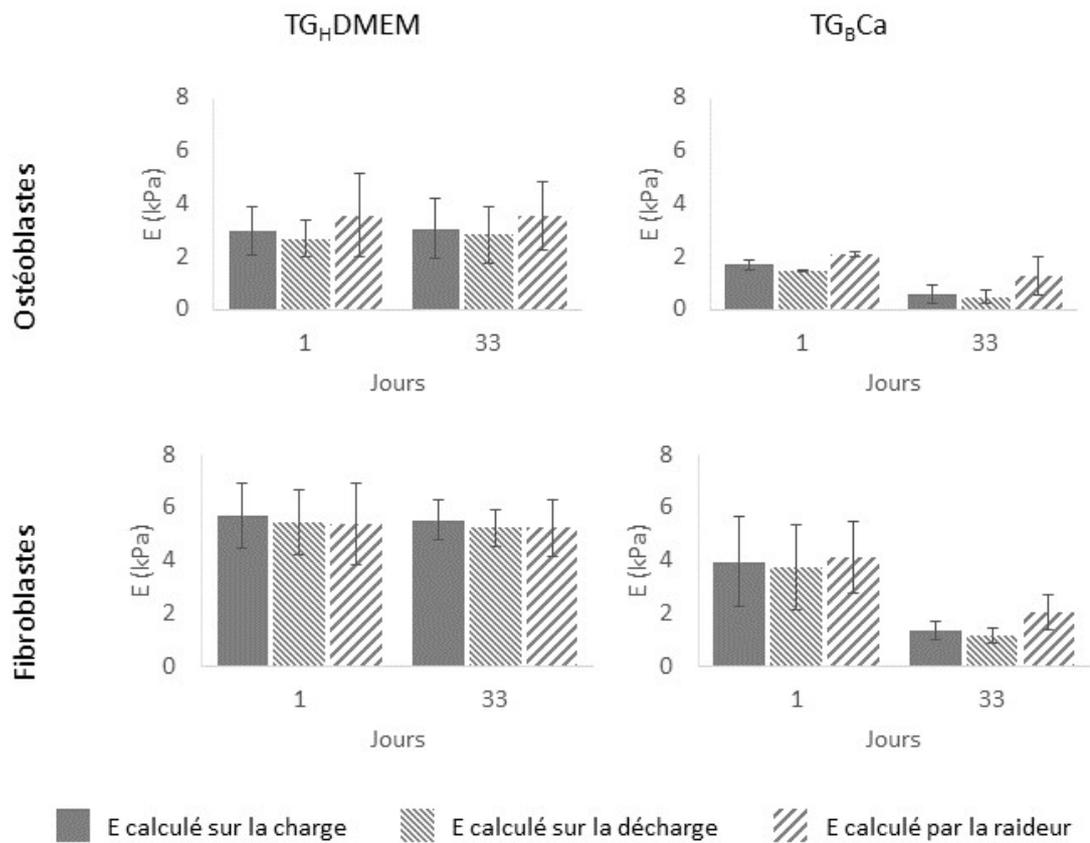


FIGURE 6.1 – Modules d'élasticité calculés par un ajustement des courbes expérimentales de force en fonction du déplacement par la relation 6.2 sur les portions de charge ou de décharge et à partir de la raideur de contact (paramètre expérimental obtenu sur la courbe de décharge).

les ostéoblastes que les modules obtenus par l’ajustement des courbes expérimentales. Cette différence est probablement attribuable d’une part à la dissipation d’une partie de l’énergie fournie au construit durant la phase de chargement (viscosité du matériau), et d’autre part à l’effet de la contribution du substrat rigide sous le construit.

Les modules d’élasticité des construits TG_HDMEM sont stables au cours du temps pour les deux types cellulaires. Cela est cohérent avec le fait que la gélatine réticulée par la transglutaminase résiste à l’action des MMP : les cellules ne peuvent pas dégrader leur environnement [263]. A l’inverse, le module d’élasticité des construits TG_BCa diminue d’un facteur 3 en 33 jours de culture, que ce soit avec les ostéoblastes ou les fibroblastes. Ce phénomène a déjà été observée dans la littérature pour des construits contenant des ostéoblastes [111, 119, 120] ou des fibroblastes [329] et a été attribué à la dégradation de l’hydrogel par les cellules. Cela leur permet de proliférer et de se déplacer dans le construit [330, 331]. Ces travaux sont cohérents avec les résultats d’analyses histologiques de nos construits (chapitre 4 et 5) : la prolifération et la sécrétion de matrice ont été bien plus marquées dans les construits TG_BCa que TG_HDMEM pour les deux types de cellules.

6.1.1.2 Correction de la contribution du substrat

Le modèle de Hertz fait l’hypothèse d’un échantillon d’épaisseur semie-infinie. Dans notre cas, les construits ont une épaisseur du même ordre de grandeur que le rayon de courbure de l’indenteur (1,6 mm). De plus, ils sont posés sur un support dont le module d’élasticité est supérieur aux modules d’élasticité des construits d’environ 5 décades. Il est donc probable que le support influence la valeur du module d’élasticité mesuré. Pour prendre en compte la contribution du support, il est nécessaire d’appliquer une fonction de correction (*bottom effect correction*) [141, 308, 332, 333].

Les résultats présentés dans la section précédente ont montré que les modules d’élasticité calculés sur les portions de charge et de décharge étaient équivalents. Les analyses se sont donc concentrées uniquement sur la décharge qui représente la réponse intrinsèque du matériau en lien avec son chargement. Deux méthodes différentes ont été retenues : la méthode de Bec *et al* [334, 335] et celle de Garcia et Garcia [308].

Dans le modèle de Bec *et al* [141, 334, 335], la raideur globale mesurée est une fonction de la raideur de l’échantillon et du substrat :

$$\frac{1}{k_z} = \frac{1}{1 + 2h/\pi a} \left[\frac{h}{\pi a^2 E_f^*} + \frac{1}{2a E_s^*} \right] \quad (6.5)$$

avec k_z la raideur apparente, a le rayon de contact, h l’épaisseur de l’échantillon et E_f^* et E_s^* les modules d’élasticité réduit respectivement de l’échantillon et du substrat. En posant $E_{app} = k_z/2a$ et $\beta = E_s^*/E_f^*$, il est possible d’exprimer le module d’élasticité de l’échantillon en fonction du module apparent E_{app} :

$$E_f^* = E_{app}^* \left[\frac{1/\beta + 2h/\pi a}{1 + 2h/\pi a} \right] \quad (6.6)$$

Dans notre cas, la valeur de β est fixée telle que $\beta = 100000$.

Le modèle de Garcia et Garcia [308] applique une fonction de correction aux valeurs de force mesurées. Ensuite, le module d'élasticité est déterminé par un ajustement des données de force en fonction du déplacement. Pour un indenteur sphérique et pour un coefficient de poisson $\nu = 0,5$, la fonction de correction de la force est définie par :

$$F_{corr} = F_0 \left[1 + \frac{1,133}{h} X + \frac{1,497}{h^2} X^2 + \frac{1,469}{h^3} X^3 + \frac{0,755}{h^4} X^4 \right] \quad (6.7)$$

Avec F_0 la valeur de force définie par l'équation 6.2 et $X = \sqrt{R\delta}$.

Pour permettre la comparaison entre les deux méthodes et les données non corrigées, les modules d'élasticité présentés ne sont plus les modules réduits (E^*) mais sont maintenant les modules d'élasticité de l'échantillon calculés à partir de la relation 6.3 pour un coefficient de Poisson $\nu = 0,5$. Cette valeur du coefficient de Poisson est communément admise pour les matériaux biologiques hydratés [308, 332, 336].

Les résultats des modèles de correction sont présentés en figure 6.2.

Les deux méthodes de prise en compte de l'effet du substrat donnent des résultats équivalents. L'amélioration des résultats apportée par le modèle de Garcia et Garcia est observée par comparaison des courbes expérimentales et théoriques (figure 6.3) et de la somme des résidus entre ces courbes (tableaux 6.3 et 6.4).

Jours	Condition	Données non corrigées (10^{-6} Pa)	Données corrigées (10^{-6} Pa)
1	TG _H DMEM	13,9 ± 10,5	9,2 ± 3,5
	TG _B Ca	158,4 ± 205,0	16,2 ± 15,6
33	TG _H DMEM	3,1 ± 0,9	6,5 ± 6,9
	TG _B Ca	141 ± 26,6	30,4 ± 13,1

TABLE 6.3 – Somme des résidus entre les données expérimentales et les données ajustées des courbes de force des construits avec les ostéoblastes avec ou sans correction de l'effet du substrat.

La somme des résidus entre les courbes expérimentales et théoriques montre des tendances similaires pour les construits avec les ostéoblastes ou les fibroblastes. Lorsque le module d'élasticité est inférieur à 2,5 kPa, le modèle de correction de l'effet du substrat réduit l'erreur. Ainsi, après 33 jours de culture, l'erreur est 4 à 10 fois plus faible après application du modèle de correction pour les construits TG_BCa. En revanche, pour les construits TG_HDMEM la correction n'apporte aucune amélioration. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les construits TG_BCa ont un module d'élasticité plus faible que

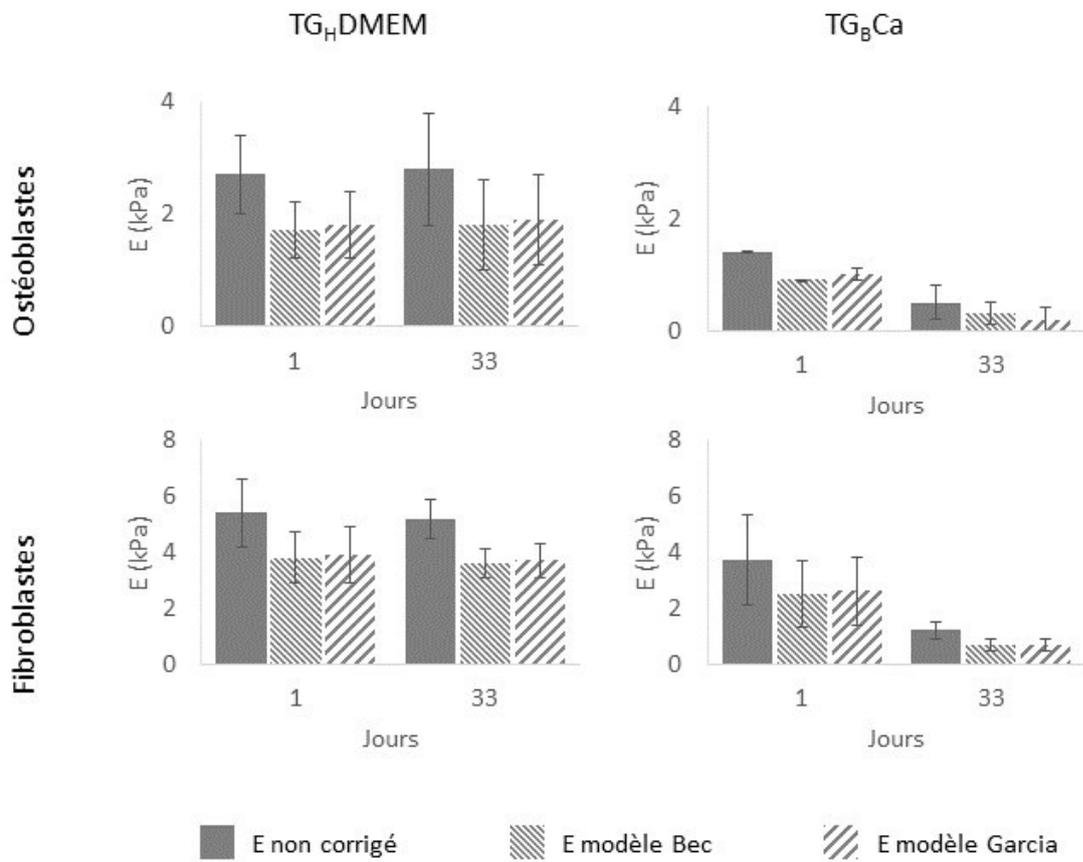


FIGURE 6.2 – Comparaison des modules d'élasticité corrigés par prise en compte de l'effet du substrat.

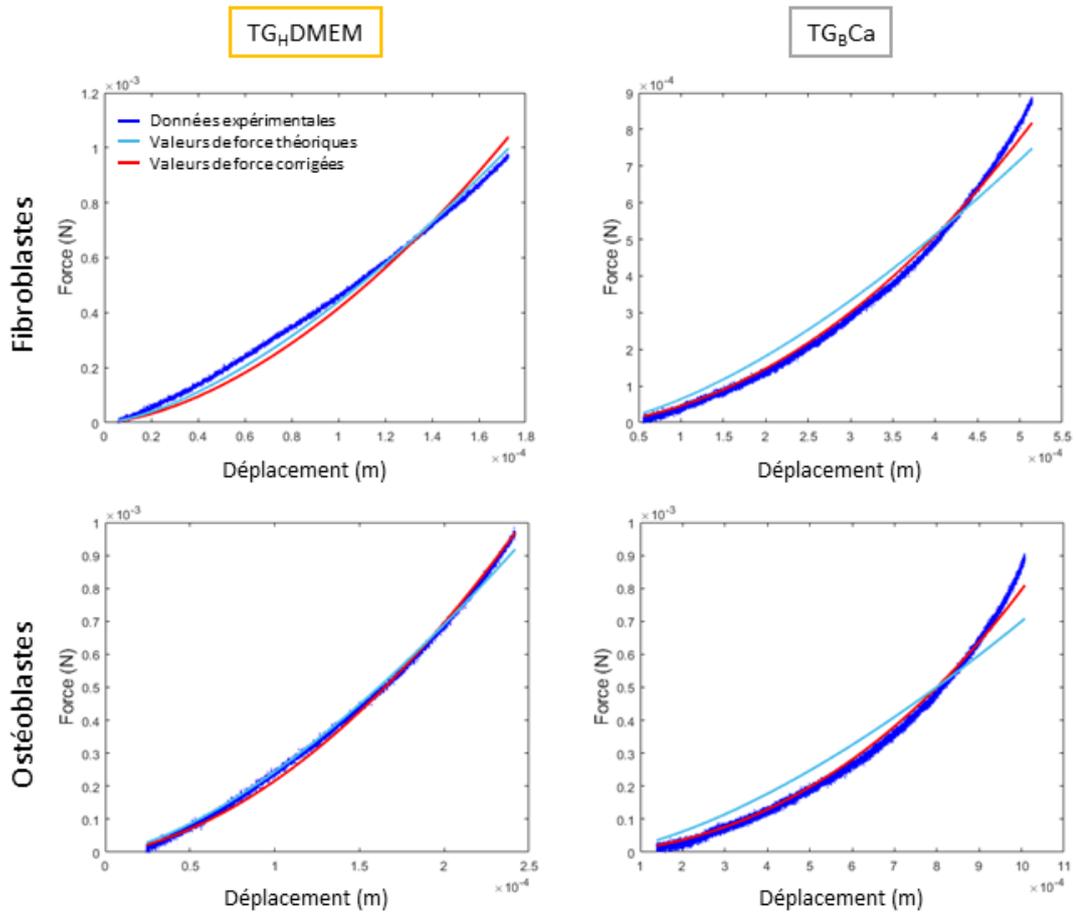


FIGURE 6.3 – Comparaison des courbes de force en fonction du déplacement (portion de décharge) après 33 jours de culture pour les données expérimentales, les données théoriques sans correction de l'effet du substrat et les données théoriques avec la correction du modèle de Garcia et Garcia [308].

Jour	Condition	Données non corrigées (10^{-6} Pa)	Données corrigées (10^{-6} Pa)
1	TG _H DMEM	$1,3 \pm 0,4$	$7,7 \pm 2,1$
	TG _B Ca	$6,6 \pm 4,3$	$8,5 \pm 1,7$
33	TG _H DMEM	$2,9 \pm 2,0$	$11,1 \pm 6,7$
	TG _B Ca	$33,8 \pm 19,8$	$9,2 \pm 5,7$

TABLE 6.4 – Somme des résidus entre les données expérimentales et les données ajustées des courbes de force des construits avec les fibroblastes avec ou sans correction de l’effet du substrat.

les construits TG_HDMEM après 33 jours de maturation. Comme les essais ont été réalisés à force constante (1 mN), le déplacement de l’indenteur dans les construits TG_BCa est plus important, donc la contribution du substrat augmente. Dans ce cas, les modules corrigés sont 2 à 3 fois plus faibles que les modules non corrigés.

Il a été démontré que l’application du modèle de Hertz donnait des résultats cohérents avec ceux attendus même si l’hypothèse des petites déformations n’étaient pas vérifiées. En revanche, l’épaisseur de l’échantillon est un critère majeur à prendre en compte lors du calcul du module d’élasticité [337]. Cela est confirmé par nos résultats : malgré des valeurs de déplacement supérieures à la limite de 10 % de l’épaisseur de l’échantillon habituellement fixée, l’utilisation du modèle de Hertz a été validée par l’obtention de valeurs de l’exposant n proches de $3/2$. Le critère majeur rapporté dans la littérature est le ratio entre le rayon de contact et l’épaisseur de l’échantillon indenté : lorsqu’ils sont du même ordre de grandeur, il est nécessaire d’appliquer une fonction de correction de l’effet du substrat [308, 338].

Malgré la facilité de mise en place et d’analyse des essais d’indentation, cette méthode est très peu utilisée pour caractériser les hydrogels dans la littérature. Les méthodes les plus répandues sont la DMA et la compression macroscopique avec des indenteurs plats. La contribution éventuelle du substrat aux mesures n’est jamais discutée, il est donc difficile de comparer nos données avec les valeurs présentées dans la littérature.

Les essais d'indentation réalisés sur nos construits ont été analysés avec le modèle de Hertz pour les matériaux élastiques dans un premier temps car l'écart à l'élasticité reste inférieur à 10 %. La baisse du module d'élasticité observée après 33 jours de culture dans les construits TG_BCa pour les deux types de cellules a été attribuée à la dégradation de l'hydrogel par les cellules pour leur permettre de migrer et de sécréter leur propre matrice extracellulaire. La sécrétion de matrice n'a pas suffi à compenser la dégradation de l'hydrogel. Comme l'enfoncement dans les construits TG_BCa est important et que leur module d'élasticité est faible devant celui du support sur lequel ils sont posés durant les essais, il est nécessaire d'appliquer une fonction de correction pour prendre en compte l'effet du substrat dans les valeurs de force mesurées. Les deux modèles évalués ont donné des résultats équivalents et ont permis de diminuer l'erreur entre les données théoriques et les données expérimentales.

6.1.2 Analyse des propriétés viscoélastiques des construits

Nous avons montré dans la section précédente que les construits pouvaient être assimilés à des matériaux élastiques en première approximation. Cependant, pour les deux types cellulaires, la fraction élastique des construits TG_BCa diminue de plus de 10 % entre le premier et le dernier jour de culture. Cela est cohérent avec l'augmentation de la valeur de l'exposant n de la loi puissance qui lie la force et le déplacement (6.2) : l'écart à l'élasticité augmente après 33 jours de culture car la dissipation visqueuse augmente. Le modèle de Hertz permet de modéliser le comportement mécanique de matériaux élastiques, à partir de leur module d'élasticité et de la géométrie du contact. Pour les matériaux viscoélastiques, le comportement mécanique est représenté par des modèles rhéologiques composés de ressorts (pour représenter le caractère élastique) et d'amortisseurs (pour représenter la dissipation visqueuse) disposés en série ou en parallèle. Lorsque les effets de la viscosité des construits ne peuvent plus être négligés, le module d'élasticité apparent établi à partir du modèle de Hertz (6.2) n'est plus pertinent. Il est donc nécessaire d'utiliser une méthode intégrant la viscosité du matériau pour estimer ses caractéristiques mécaniques [339].

Les méthodes de référence pour quantifier la dissipation visqueuse d'un matériau sont la DMA ou les essais de relaxation (ou de fluage). Ces méthodes sont plus compliquées à mettre en place que l'essai d'indentation et sont plus longues, ce qui provoquent des risques de déshydratation des hydrogels, ainsi qu'une dérive des capteurs au cours de la mesure [339, 340]. En réponse à ces inconvénients, des méthodes d'analyse des courbes d'indentation ont été développées pour prendre en compte la viscoélasticité des matériaux. Le modèle de Ting [341] fournit une solution pour l'indentation d'un matériau viscoélastique par un indenteur axisymétrique rigide, quel que soit l'historique de charge. Pour un indenteur sphérique, les relations qui lient la force et le déplacement sont les

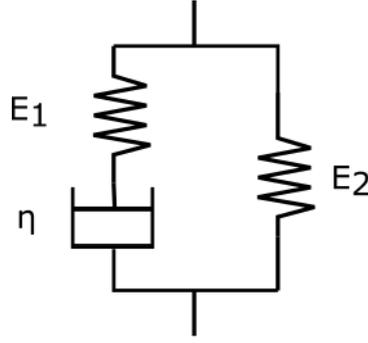


FIGURE 6.4 – Représentation du modèle SLS : un ressort en parallèle d'un ressort et d'un amortisseur en série.

suivantes :

$$F(t, \delta(t)) = \begin{cases} \frac{4\sqrt{R}}{3(1-\nu^2)} \int_0^t E(t-\xi) \frac{\partial \delta^{3/2}}{\partial \xi} d\xi, & 0 \leq t \leq t_m \\ \frac{4\sqrt{R}}{3(1-\nu^2)} \int_0^{t_1(t)} E(t-\xi) \frac{\partial \delta^{3/2}}{\partial \xi} d\xi, & t_m \leq t \leq t_{ind} \end{cases} \quad (6.8)$$

avec δ le déplacement de l'indenteur, t le temps tel que $t = 0$ au point de contact entre l'indenteur et l'échantillon, t_m le temps à la fin de la phase de charge, t_{ind} le temps à la fin de la phase de décharge, ξ la variable de temps requise pour l'intégration, $E(t)$ le module de relaxation, ν le coefficient de poisson, R le rayon de courbure de l'indenteur et $t_1(t)$ la fonction définie par :

$$\int_{t_1(t)}^t E(t-\xi) \frac{\partial \delta}{\partial \xi} d\xi = 0 \quad (6.9)$$

Le module de relaxation $E(t)$ est une fonction décroissante qui peut être décrite par des modèles rhéologiques. Les modèles viscoélastiques les plus couramment utilisés sont le *standard linear solid* (SLS) et le *power law rheology* (PLR). Il a été montré que le modèle PLR est plus adapté à la modélisation des cellules alors que le modèle SLS (figure 6.4) convient mieux aux hydrogels [339, 340]. Dans le cas du modèle SLS, le module de relaxation est défini par :

$$E(t) = E_\infty + (E_0 - E_\infty)e^{-t/\tau} \quad (6.10)$$

où E_∞ désigne le module d'élasticité à l'équilibre, E_0 le module d'élasticité instantané et τ le temps de relaxation.

L'implémentation de l'algorithme MATLAB pour calculer E_∞ , E_0 et τ a été réalisée en collaboration avec Robin Chatelin, maître de conférences en mathématiques appliquées à l'ENISE.

L'estimation des paramètres viscoélastiques du modèle de Ting [341] est un problème complexe d'optimisation. En plus des paramètres E_0 , E_∞ et τ , il faut trouver tous les instants t_1 afin de satisfaire l'équation 6.9. Cela aboutit donc à un problème d'optimisation en très grande dimension puisqu'il y a $N_d + 3$ inconnues où N_d est le nombre de point échantillonnés dans la partie décharge du signal. Dans le cas de nos essais, N_d peut être supérieur à 40000.

La stratégie numérique de résolution de ce problème d'optimisation est fractionnée en trois étapes décrites ci-dessous.

1. Dans un premier temps, les trois paramètres du modèle rhéologique SLS E_0 , E_∞ et τ sont estimés sur la charge du cycle d'indentation. Ceci est réalisé grâce à un algorithme classique de moindres carrés qui permet de trouver le jeu de paramètres qui minimise le résidu entre la première équation du modèle (6.8) et les données. Dans ces calculs, la fonction δ est supposée linéaire (imposée par le dispositif expérimental). Il aurait été possible de travailler avec le signal δ échantillonné, mais comme ces données sont très bruitées, le calcul de sa dérivée aurait accentué ce bruit. La plupart des travaux qui utilisent cette méthodologie réalisent un filtrage gaussien après une estimation numérique de cette dérivée [339].
2. Les paramètres E_0 , E_∞ et τ sont fixés et on recherche ensuite les instants t_1 qui satisfont l'équation 6.9. Il s'agit d'un problème d'optimisation non convexe, non linéaire et qui possède plusieurs solutions. Il existe notamment une solution "évidente" non acceptable en égalisant les deux bornes de l'intégrale : $t_1(t) = t$.
3. Les paramètres $t_1(t)$ sont maintenant fixés et les trois paramètres E_0 , E_∞ et τ sont à nouveau estimés sur la décharge en utilisant la même méthodologie que dans la première étape afin de satisfaire la seconde équation du système (6.8).

Plusieurs algorithmes de résolution ont été comparés pour la deuxième étape. Les algorithmes standards d'optimisation (gradient conjugué, Levenberg-Marquardt, ...) convergent vers la solution évidente non admissible. C'est pourquoi des algorithmes génétiques ont été utilisés. Les algorithmes de recuit simulés et PSO (*Particle swarm optimization*) permettent de converger vers une solution acceptable. L'algorithme PSO convergeant plus rapidement, c'est celui-ci qui a été choisi.

La stratégie décrite ci-dessus est largement utilisée dans la littérature [339, 342]. Néanmoins, les paramètres rhéologiques estimés à l'étape 3 ne sont plus compatibles avec les paramètres $t_1(t)$ qui avaient été calculés à l'étape 2. C'est pourquoi une méthode itérative a été mise en œuvre en répétant les étapes 2 et 3 jusqu'à ce que le résidu entre deux itérations successives soit suffisamment petit. Cette méthode converge en quelques itérations (entre 3 et 12 selon le jeu de données) et permet d'aboutir à un modèle qui satisfait les équations 6.8 et 6.9 sur tout le cycle de décharge. Pour nos échantillons, les résultats sont significativement modifiés. Cette méthode itérative semble donc indispensable pour obtenir des résultats cohérents.

En raison du temps de calcul élevé, seuls les essais d'indentation réalisés sur les construits TG_BCa ensemencés avec les ostéoblastes ont été analysés par cette méthode. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.5. Les courbes de force en fonction du temps et de force en fonction du déplacement pour les données expérimentales et obtenues par un ajustement sont présentées en figure 6.5.

Jour	E_{Hertz} (kPa)	C_e (%)	E_0 (kPa)	E_∞ (kPa)	τ (s)	E_∞/E_0
1	$1,5 \pm 0,1$	$88,5 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,1$	$22,9 \pm 1,4$	$9,1 \cdot 10^{-2} \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$
33	$0,5 \pm 0,3$	$74,9 \pm 3,0$	$5,4 \pm 1,9$	$0,3 \pm 0,1$	$26,5 \pm 4,4$	$5,7 \cdot 10^{-2} \pm 3,5 \cdot 10^{-2}$

TABLE 6.5 – Paramètres élastiques et viscoélastiques des construits TG_BCa ensemencés avec les ostéoblastes.

Les courbes expérimentales et les données obtenues par l'ajustement avec le modèle de Ting montrent une bonne adéquation pour les essais réalisés après 33 jours de culture. En revanche, l'écart entre les courbes est plus important pour les essais réalisés le premier jour de culture. Cela peut s'expliquer par le fait que les construits ont un comportement majoritairement élastique à J1. En effet, le caractère élastique (C_e , tel que défini dans le chapitre 3) vaut 88,5 % à J1, ce qui signifie que le comportement des construits est majoritairement élastique et que le caractère visqueux est négligeable. Le modèle viscoélastique utilisé ne semble donc pas adapté en l'état.

Les modules d'élasticité calculés par la méthode de Hertz donnent des valeurs comprises entre celles de E_0 et celles de E_∞ , comme cela a déjà été observé dans la littérature [339]. La diminution du ratio E_∞/E_0 après 33 jours de culture traduit une augmentation de la viscosité. Cela est cohérent avec l'augmentation de l'hystérésis (et donc la diminution de C_e) évaluée sur les courbes d'indentation.

Dans la littérature, cette méthode a été appliquée sur des essais d'indentation réalisés par AFM sur des cellules. Elle a notamment permis de différencier des cellules cancéreuses de cellules saines [339], ou bien la réponse des cellules à certaines molécules [340]. Cependant, à notre connaissance, c'est la première fois qu'elle est appliquée à la sécrétion de matrice par des cellules ensemencées dans un hydrogel.

Il a été montré que les matériaux biologiques possèdent un comportement viscoélastique [257]. La variation des propriétés viscoélastiques des hydrogels impactent le comportement des cellules [257]. Il est donc important de caractériser les propriétés viscoélastiques des hydrogels. Cheng et Cheng [343] ont démontré que le calcul du module d'élasticité instantané (E_0) des matériaux viscoélastiques à partir de la raideur de contact est possible si la durée de la décharge est inférieure au temps de relaxation d'un facteur 10 à 100. Dans notre cas, cela impliquerait un temps de décharge de 0,3 à 3 s, correspondant à une vitesse d'indentation de 250 $\mu\text{m/s}$ à 2500 $\mu\text{m/s}$. Ces vitesses n'étant pas atteignable avec notre dispositif, il est nécessaire d'utiliser un modèle viscoélastique complet pour analyser les courbes d'indentation. La méthode présentée ici s'appuie sur des fondements théoriques

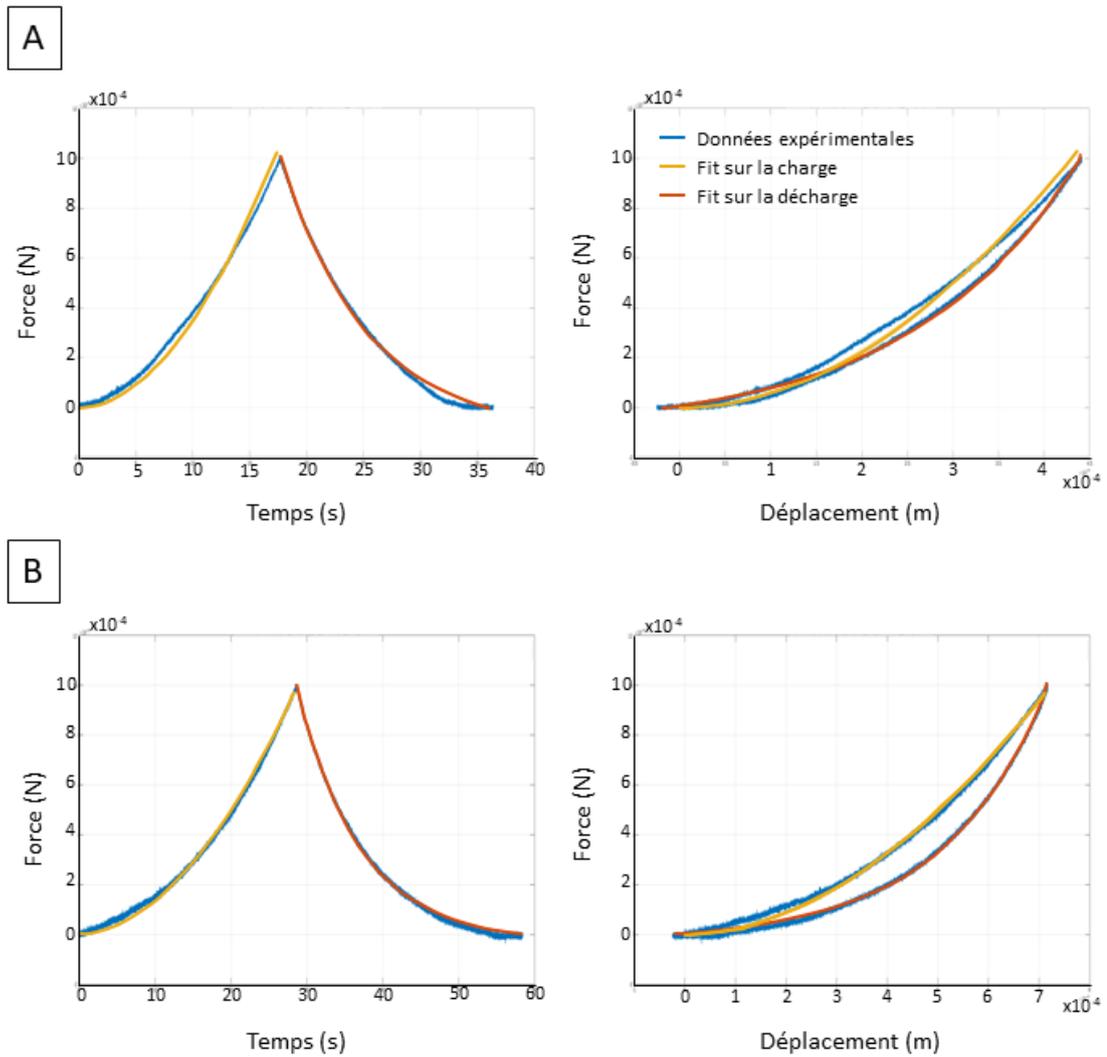


FIGURE 6.5 – Comparaison des courbes d’indentation (force en fonction du temps et force en fonction du déplacement) pour les données expérimentales et les fits par un modèle viscoélastique. A : Courbes d’indentation au premier jour de culture. B : Courbe d’indentation après 33 jours de culture.

solides (le modèle de Ting [341]) et peut être appliquée sur les courbes habituelles de force-déplacement [339].

Nous avons choisi de décrire la fonction de relaxation du module d'élasticité par un modèle rhéologique SLS, aussi appelé Maxwell généralisé à une branche. D'autres modèles sont couramment utilisés dans la littérature pour modéliser les comportements viscoélastiques. Ainsi, le modèle généralisé de Maxwell peut comporter plusieurs branches, ce qui contribue à améliorer l'ajustement des données expérimentales [339]. Le modèle PLR, utilisé couramment pour modéliser les courbes d'indentation sur les cellules [339, 340, 344] permet de réaliser un ajustement des courbes expérimentales avec seulement deux paramètres : le module instantané E_0 et l'exposant de la loi puissance. Enfin, le modèle de Kelvin-Voigt est également un modèle couramment utilisé dans la littérature. Cependant, des simulations ont montré que les courbes d'indentation avec ce modèle présentaient une discontinuité des valeurs de force au maximum de déplacement dans l'échantillon [342, 344]. Ce comportement n'étant pas observé sur les courbes d'indentation de nos construits, nous avons écarté ce modèle.

Peu d'études de la littérature ont rapporté l'évolution du module d'élasticité des hydrogelsensemencés avec des cellules osseuses (cellules souches mésenchymateuses, ostéoblastes ou ostéocytes) au cours de la culture. Parmi les études qui ont évalué les propriétés mécaniques des hydrogels au cours du temps, une seule en a évalué le comportement viscoélastique [113]. Cette étude a montré une augmentation du facteur de perte ($\tan \delta = G''/G'$), et donc une augmentation de la viscosité, après 28 jours de culture. L'augmentation de la viscosité a été attribuée à la sécrétion de certains composants de la matrice, et notamment les glycosaminoglycanes qui forment une substance visqueuse en se liant aux molécules d'eau. Nos résultats sont donc cohérents avec cette étude : la sécrétion de collagène après 33 jours de culture est liée à l'augmentation la viscosité de nos construits.

6.1.3 Discussion

Une des limitations de nos travaux est la réalisation des essais d'indentation à force constante et non à déplacement constant. Cela était nécessaire car les forces d'attraction causées par l'indentation en immersion empêchaient la détection automatique de la surface des construits. Or cette étape est indispensable pour déterminer le déplacement de l'indenteur dans les construits. Comme le module d'élasticité des construits a diminué au cours du temps, le déplacement de l'indenteur pour atteindre le même seuil de force a augmenté. En conséquence, le temps d'indentation des construits a augmenté. Ainsi, même si la vitesse d'indentation était maintenue constante, la vitesse de déformation, elle, a varié entre les mesures. Pour les matériaux viscoélastiques, cela peut avoir un impact sur les paramètres mesurés [342]. Ainsi, les résultats pourraient sans doute être améliorés si les mesures étaient réalisées à vitesse et profondeur d'indentation constantes.

Un autre axe d'amélioration concerne la prise en compte des effets du substrat. Nous avons montré dans la section précédente que le substrat rigide sur lequel étaient posés les construits lors des mesures d'indentation contribuait aux valeurs de force mesurées, ce qui modifiait les valeurs de module d'élasticité apparent. Les mêmes effets se produisent avec les modèles viscoélastiques. Il a ainsi été montré par Garcia *et al* [344] que le module d'élasticité instantané apparent était augmenté et la viscosité apparente diminuée dans le cas d'échantillons fins et mous posés sur un substrat rigide. Les résultats pourraient donc être améliorés en implémentant une fonction de correction, comme cela a été fait pour les modèles élastiques.

Nous avons montré que les essais d'indentation classiques peuvent être exploités pour déterminer les paramètres viscoélastiques des construits. En appliquant un modèle SLS (*Standard Linear Solid*, aussi appelé Maxwell généralisé à une branche), nous avons calculé le module instantané, le module à l'équilibre et le temps de relaxation des construits. Le ratio du module à l'équilibre et du module instantané a confirmé que la viscosité des construits augmentait dans le temps. Cette méthode est particulièrement utile car les essais d'indentation sont plus simples à mettre en place que les essais de relaxation ou de DMA habituellement utilisés pour caractériser les matériaux viscoélastiques. De plus, la matrice extracellulaire possède un comportement viscoélastique qui ne peut pas être représenté correctement par un modèle élastique. Il est donc nécessaire d'employer des modèles viscoélastiques pour mesurer ces propriétés mécaniques.

6.2 Quantification des forces de contraction des cellules

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans la revue *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (doi 10.1016/j.jmbbm.2022.105365).

Les essais de contraction basés sur la mesure de surface ont été largement utilisés pour évaluer la contractilité cellulaire dans les modèles 3D. Cette méthode est simple et ne nécessite aucun équipement spécifique, mais elle ne fournit pas de données quantitatives sur les forces de contraction générées par les cellules. Nous avons élargi cette méthode avec un nouveau modèle biomécanique, basé sur le théorème de l'énergie cinétique, pour fournir un suivi longitudinal non destructif des forces de contraction générées par les cellules en 3D.

Nous avons appliqué cette méthode sur des hydrogelsensemencés avec des fibroblastes ou des ostéoblastes. Les caractéristiques mécaniques des hydrogels ont été modulées pour améliorer (condition HCA_{High} : forte contraction de l'hydrogel) ou limiter (condition HCA_{Low} : faible contraction) les comportements contractiles des cellules. Les mesures macroscopiques ont ensuite été corrélées avec le comportement contractile des cellules et l'analyse descriptive de leur physiologie en réponse à différents environnements mécaniques.

Les fibroblastes et les ostéoblastes ont contracté leur matrice jusqu'à 47 % et 77 % respectivement. La contrainte de contraction a culminé au jour 5 avec $1,1 \cdot 10^{-14}$ Pa pour les fibroblastes et $3,5 \cdot 10^{-14}$ Pa pour les ostéoblastes, ce qui était corrélé à l'attachement et à la propagation des cellules. Une contraction négligeable a été observée dans HCA_{low}. Les fibroblastes et les ostéoblastes ont exprimé des fibres contractiles α -SMA dans HCA_{High} et HCA_{low}. L'incapacité à contracter les hydrogels HCA_{low} a été attribuée à une réticulation accrue et à une résistance à la dégradation protéolytique de l'hydrogel.

Quantification of cell contractile behavior based on non-destructive macroscopic measurement of tension forces on bioprinted hydrogel

Authors

Sarah Pragnere¹
Naima El Kholti²
Leslie Gudimard³
Lucie Essayan³
Christophe Marquette³
Emma Petiot³
Cyril Pailler-Mattei^{1,4}

Addresses:

¹ Laboratory of Tribology and System Dynamics UMR-CNRS 5513, Ecole Centrale de Lyon, France

² UMR 5305, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory (LBTI), University of Lyon, CNRS, 69367 Lyon, France.

³ 3d.FAB, Univ Lyon, Université Lyon1, CNRS, INSA, CPE-Lyon, ICBMS, UMR 5246, 43, Bd du 11 Villeurbanne cedex, France

⁴ University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISPB-Faculté de Pharmacie de Lyon, France

Corresponding authors :

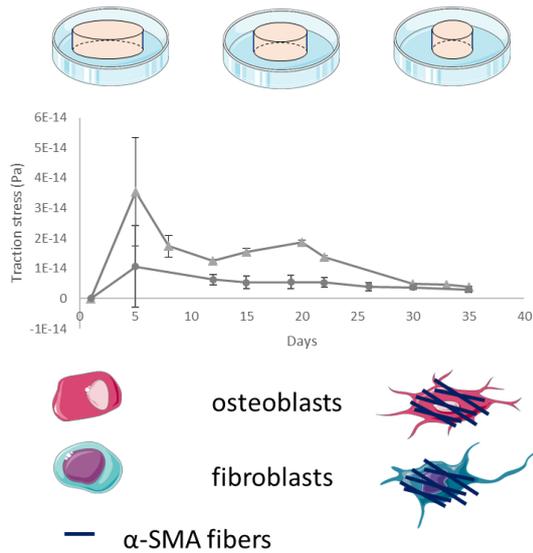
Sarah Pragnere: sarah.pragnere@ec-lyon.fr

Cyril Pailler-Mattei: cyril.pailler-mattei@ec-lyon.fr

ABSTRACT

Contraction assay based on surface measurement have been widely used to evaluate cell contractility in 3D models. This method is straightforward and requires no specific equipment, but it does not provide quantitative data about contraction forces generated by cells. We expanded this method with a new biomechanical model, based on the work-energy theorem, to provide non-destructive longitudinal monitoring of contraction forces generated by cells in 3D.

We applied this method on hydrogels seeded with either fibroblasts or osteoblasts. Hydrogel mechanical characteristics were modulated to enhance (condition HCA_{High}: hydrogel contraction assay high contraction) or limit (condition HCA_{Low}: hydrogel contraction assay low contraction) cell contractile behaviors. Macroscopic measures were further correlated with cell contractile behavior and descriptive analysis of their physiology in response to different mechanical environments. Fibroblasts and osteoblasts contracted their matrix up to 47% and 77% respectively. Contraction stress peaked at day 5 with $1.1 \cdot 10^{-14}$ Pa for fibroblasts and $3.5 \cdot 10^{-14}$ Pa for osteoblasts, which correlated with cell attachment and spreading. Negligible contraction was seen in HCA_{Low}. Both fibroblasts and osteoblasts expressed α -SMA contractile fibers in HCA_{High} and HCA_{Low}. Failure to contract HCA_{Low} was attributed to increased cross-linking and resistance to proteolytic degradation of the hydrogel.



KEY WORDS

contraction assay – osteoblasts – fibroblasts – biocompatible hydrogel – mechanical properties - bioprinting

ABBREVIATIONS

α -SMA: α -Smooth Muscle Actin

HCA_{high}: Hydrogel Contraction Assay high contraction

HCA_{low}: Hydrogel Contraction Assay low contraction

ECM: Extra-cellular Matrix

FBS: Foetal bovine Serum

MMP: matrix metalloproteases

INTRODUCTION

3D cell culture has been used for several decades to develop *in vitro* biological models and to study cell behavior for applications in pharmacology and regenerative medicine. This is notably useful to treat burns or chronic wounds with skin substitutes [1–4], or to repair critical-sized bone defects [5]. 3D cell culture can also provide models to study of a variety of biological functions and behaviors like the responses to mechanical or biochemical stimuli [6–9], to cellular ageing [10] or the impact of genetic disease [11].

Two different approaches co-exist for 3D cell culture: cell seeding on porous scaffolds [3,10,12,13] or cell embedding in hydrogels made of biocompatible hydrogels [8,14,15]. Among these hydrogels, collagen has been extensively studied, being one of the most abundant proteins of the extracellular matrix (ECM) in connective tissues [16], including dermis [17], bone [18], cartilage [19] and tendon [20].

ECM impacts cellular fate by providing mechanical support and attachment for cells [16]. *In vivo*, it is secreted by tissue resident cells [16], and is constantly remodeled. ECM is successively degraded by matrix metalloproteases (MMP) and neo-synthesized [21]. 3D cell culture models aim at reproducing such mechanisms to replace existing artificial scaffolds or hydrogels with an *in-vivo* like matrix.

During cultivation of 3D *in vitro* models, cells generate tractional forces. When they are seeded on compliant materials such as collagen hydrogels, such forces reshape the structures surrounding the cells [22,23]. This results in changes of hydrogels volume, mostly along the radial direction [24], which is known as matrix contraction [22]. Several resident cells can contract their matrix such as dermal fibroblasts [25], osteoblasts [26], chondrocytes [27] and tenocytes [28].

Matrix contraction involves two main mechanisms, which both require cells to possess an actin cytoskeleton [22,29,30]. First cellular behavior is cell traction on matrix fibers during cell attachment and locomotion. This happens during the first phase of wound healing when fibroblasts migrate towards the damaged tissues [31]. This has also been observed *in vitro* for fibroblasts embedded in free-floating collagen hydrogels [32]. The second cellular behavior is cell contraction (*i.e.* cell shortening) transmitted to the tissue. It requires expression of extracellular α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) fibers and strong focal adhesions [33–35].

Although studies focused mainly on fibroblasts, osteoblasts in collagen hydrogel showed greater contractability [36]. *In vitro*, expression of α -SMA by fibroblasts was observed on deformable silicon membrane, generating significantly higher material deformation than non-expressing cells [35]. Osteoblasts were also described to transiently express α -SMA during fracture healing [37] and to contract collagen hydrogels sufficiently to bring in contact two pieces of scaffold embedded in the same collagen hydrogel [5].

Contraction of collagen alters the structure of a tissue and the behavior of the resident cells. As connective tissues provide support for other tissues, matrix contraction can impact body physiology [22]. Contractility is notably involved in wound healing [22,33] and in fracture healing [37]. Dysregulation of matrix contraction can lead to hypertrophic scar [31] or cancer [24,38]. Thus, it is of major interest to understand how and why cells interact with their environment.

Collagen hydrogel contraction *in vitro* was first mentioned by Elsdale and Bard in 1972. They noticed a “gradual collapse of the lattice to a dense, opaque body less than one-tenth of the original size” of their collagen hydrogel seeded with fibroblasts [39]. Since then, it has been studied at macroscopic and microscopic scales. Bell and co-workers introduced collagen contraction assays to evaluate fibroblasts behavior in collagen hydrogels [25]. This macroscopic method has been widely applied as it requires only images of hydrogels or scaffolds to monitor surface area [4,23,24,26,29,40,41]. It has the benefit to be non-destructive and supports longitudinal monitoring. However, this method provides merely qualitative data with percentage of contraction but no quantitative data on the contraction forces generated by cells. To overcome such limitation, a first set of methods focused on deformation

of 2D supports by the cells, such as deformable membrane [42], traction force microscopy [43] or elastic micro-pillar [44]. Although they provide quantitative data on forces generated by individual cells, these techniques are limited to 2D cultures and failed to be transferred to 3D environment to mimic *in vivo* traction forces. Traction force microscopy has been adapted to 3D cell culture system [30,45] but it is mostly used with purely elastic materials that do not reproduce the biochemical and mechanical properties of ECM [23,24]. Another major drawback is the inherent evolutive behavior of cells. During the remodeling process, cells are concomitantly degrading their support and synthesizing their own ECM [45], which induce strong changes in material support mechanical properties [46,47]. As precise knowledge about material elasticity and viscosity is required, traction force microscopy has been limited to 90 minutes studies [45,48].

Culture force monitoring devices have been developed to directly measure macroscopic forces generated by cells in 3D [49–52]. Hydrogels are clamped to strain gauges that measure the contraction forces generated by cells. This technique provides useful quantitative follow-up but the system setup applies a static tensional force on cells, which is known to influence cell behavior [21,53,54]. This model reproduces wound healing whereas free-floating hydrogels are closer to dermis model [22].

Consequently, after 40 years of methods development, there is still a need for a non-destructive technique to monitor quantitatively cell contraction during *in vitro* cultivation of 3D models which could closely imitate *in vivo* tissue behaviors.

We aimed to develop a new biomechanical model to non-destructively quantify cell contraction forces. Hydrogels seeded with fibroblasts or osteoblasts, known for their contractile behavior, were monitored by longitudinal analysis of hydrogel surface over 35 days. Cylindrical hydrogels were 3D bioprinted to procure an isotropic biomaterial. Hydrogels supporting cell growth were modulated in term of mechanical characteristic to enhance or limit cell contractile behaviors. Macroscopic measures were further correlated with cellular contractile behavior and descriptive analysis of their physiology in response to different mechanical environments.

MATERIAL AND METHODS

- Cells' isolation and cultivation

Foreskin fibroblasts [15] were cultivated in flasks in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/Glutamax medium (Gibco™ #31966021), supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco™ # A3160802). Primary human osteoblasts were purchased from PromoCell (#C-12720) and grown in flasks with DMEM low glucose (Dutscher #L0064) supplemented with 10% foetal bovine serum (PAN-Biotech #500105) and 50µg/mL ascorbic acid (Sigma #A8960). All 2D cultured cells were grown in an incubator at 37°C and 5% CO₂.

- Bio-Ink Formulation & bioprinting protocols

The isotropic shapes of tissue constructs were designed as cylinder geometries of 10mm diameter and 1.6mm thickness. Based on an in-house patented formulation [15,55,56], the bio-ink was formulated as a mixture of 5% (w/v) bovine gelatin (Sigma #G1890), 2% (w/v) very low viscosity alginate (Alpha Aesar # A18565), and 2% (w/v) fibrinogen (Sigma # F8630) dissolved overnight in DMEM without

calcium (Gibco™ #21068028) at 37 °C. Just before printing, fibroblasts or osteoblasts were trypsinized and suspended in the bio-ink to obtain 3×10^5 cells mL⁻¹. After homogenization, a 10ml sterile syringe (Nordson EFD) was loaded and incubated at room temperature. Tissue constructs were consolidated by 60 min incubation in either a solution HCA_{high} containing 3% w/v CaCl₂, 0.2% w/v transglutaminase (Ajinomoto ActivaWM) and 20 U/mL of thrombin (Sigma # T4648-10KU) or a solution HCA_{low} containing DMEM medium with 0.02% calcium, 4% w/v transglutaminase and 20 U/mL thrombin. Following consolidation step, constructs were then rinsed three times with sterile NaCl 0.9% (Versol).

- Tissue cultivation & monitoring

After the consolidation step, tissue constructs were grown in 12-well plates for 35 days at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Culture medium was renewed twice a week. For the dermis model, freshly prepared ascorbic acid at 50µg/mL was added at each medium renewal. For the bone constructs, osteogenic medium consisted in 50µg/mL ascorbic acid, 5mM β-glycerophosphate (Sigma #G9422) and 100 nM dexamethasone (Sigma # D4902).

Tissue construct contraction was monitored by macroscopic images of the tissues. ImageJ was then used to determine the tissue construct area in reference of well area of the culture plates. Well and tissue construct areas were measured in pixels by manual contouring. The known area in square centimeters of the well was used to set scale and convert square pixels in square cm (Supplementary S1). At least 3 tissue constructs were measured at every time point.

Cell viability and proliferation were assessed by calcein-AM staining (Invitrogen™ #C1430). Tissue constructs were incubated with 0.5mL of 2µM calcein-AM for 30 minutes at 37°C, washed in PBS and imaged using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ts2R) equipped with a 475nm filter. To evaluate proliferation, cell growth kinetics were obtained by cell counting after tissue constructs enzymatic dissolution. Tissue constructs were washed in PBS and incubated 10 minutes in 1mL of 0.05% trypsin. 1mL medium supplemented with FBS was used to stop the trypsin action. After pelleting by centrifugation, tissue constructs were washed with 2mL PBS and further incubated in 30mg/mL collagenase A (Merck # COLLA-RO). Vigorous shaking was applied every five minutes until complete dissolution of the tissue construct, which commonly occurs within 10 to 20 minutes. After a last pelleting by centrifugation, extracted cells were resuspended and counted using a hemacytometer.

- Characterization of cell morphology

Tissues were fixed overnight in paraformaldehyde at 4°C. They were then dehydrated in a gradient of ethanol, followed by paraffin embedding and cut into 5µm sections. Phalloidin staining of actin filaments in the tissues with fibroblasts was performed on histological sections after deparaffinization and rehydration. Samples were permeabilized in acetone at -20°C for 3 minutes then washed two times in deionized water. Sections were incubated with Alexa Fluor™ 546 Phalloidin at 5 U/mL for 45 minutes to stain the actin cytoskeleton and nuclei were counterstained with 300nM DAPI dilactate for 5 minutes. Images were acquired with an Axio Scan.Z1 (Zeiss) equipped with a 20X objective and 405 nm and 561 nm filters. In case of osteoblasts, analysis was performed by confocal microscopy right after paraformaldehyde fixation. Tissues were permeabilized with 0.1% TritonX-100 for 15 minutes, washed in PBS then incubated with Alexa Fluor™ 546 Phalloidin (Invitrogen™ #A22283) at 5 U/mL for 90 minutes to stain the actin cytoskeleton and 5 minutes with 300nM DAPI dilactate (Invitrogen™

#D3571) to stain the nuclei. This allowed us to better visualize few numbers of cells which were ten times lower than fibroblasts. Confocal scans were acquired using a Zeiss LSM 880 microscope equipped with 40X immersion objective and 405 nm and 561 nm filters. Maximum intensity images were generated from z-stacks with a distance of 2 μ m between each slice.

- Characterization of cell phenotypes

After deparaffinization and rehydration, antigen retrieval was performed in 10mM citrate buffer (pH 6) for 20 minutes at 100°C. The following steps were performed with the ImmPRESS® Excel Amplified Polymer Kit (Vector Laboratories, MP-7602) according to manufacturer's instructions. Endogenous peroxidases were blocked with BLOXALL for 10 minutes, and non-specific binding sites were blocked by incubation with BlockAid blocking solution (ThermoFisher, B10710) for 30 minutes. Primary antibody (α -SMA 1:800, Sigma, A2547) was incubated overnight at 4°C. After washing in PBS, Amplifier Antibody (goat anti mouse) was incubated for 15 minutes followed by 30 minutes incubation with ImmPRESS Excel Amplified HRP Polymer Reagent. Revelation was performed using ImmPACT® DAB EqV Substrate. Nuclei were counterstained with Gill's Hematoxylin.

- Mechanical properties analysis by Micro-indentation

After one night in the incubator to equilibrate, mechanical properties of the tissue constructs were measured by an in-house developed light load indentation device [46]. Indentation tests were carried out at constant applied normal load $F_z=1$ mN and constant indentation speed $V=25$ μ m.s⁻¹. The indenter used was a spherical PTFE indenter, with a radius of curvature $R=1.6$ mm. Measurements were repeated at least 3 times per sample and each type of sample was indented in duplicate.

RESULTS & DISCUSSION

Since Bell and co-workers introduced collagen gel contraction assay [25], it has been extensively used to study fibroblasts [4,9,57,58] or osteoblasts [5,29,41] ability to contract a collagen hydrogel. We applied a similar methodology on hydrogels made of gelatin, alginate and fibrinogen containing either fibroblasts or osteoblasts. We used hydrogel contraction assay (HCA) to monitor tissue constructs macroscopic contraction and we correlated it to morphology of actin cytoskeleton and expression of α -SMA fibers. To identify different cell biological behaviors, we selected two hydrogel conditions: one allowing a high degree of contraction, named HCA_{High}, and one limiting the contraction effect, named HCA_{Low}.

I. Cross-linking impact on mechanical properties of synthetic ECM / biomatrix

1. Mechanical properties of hydrogels

Hydrogel formulation and consolidation protocols were adapted from Pourchet *et al.* [15] as they were known to provide good fibroblast proliferation. Mechanical properties were hardly measured with the original formulation and consolidation conditions as tissue constructs collapsed during indentation measurement. A new reticulation protocol was tested with the addition of 4% transglutaminase enzyme to reticulate gelatin of the hydrogel formulation. Hydrogel elastic modulus thus reached 32.0 10^3 Pa \pm 99 Pa allowing for indentation measurement. Nevertheless, no cell proliferation and tissue construct contraction were observed. These preliminary assays demonstrated that hydrogel

biomechanical properties must be in close range allowing both cell proliferation and sample handling to measure contraction forces. On this basis, the two following combinations were satisfactory to achieve an HCA assay on fibroblast and osteoblast tissue constructs: the HCA_{low} condition, consisting in a hydrogel consolidated with 4% transglutaminase and 0.02% CaCl₂ contained in DMEM and the HCA_{high} condition, consisting in hydrogel consolidated with 0.2% transglutaminase and 3% CaCl₂. Both presented sufficient stiffness to obtain mechanical characterization and cell proliferation. Elastic modulus of HCA_{High} were $6.3 \cdot 10^3 \text{ Pa} \pm 1.3 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ for fibroblasts and $3.7 \cdot 10^3 \text{ Pa} \pm 755 \text{ Pa}$ for osteoblasts. Elastic modulus of HCA_{Low} were in the same range with $7.0 \cdot 10^3 \text{ Pa} \pm 1.4 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ for fibroblasts and $6.3 \cdot 10^3 \text{ Pa} \pm 192 \text{ Pa}$ for osteoblasts. These values were in the same range as those observed for skin [59]. The newly synthesized bone matrix, produced in vitro by an osteoblast cell line, displayed an elastic modulus of $27 \text{ kPa} \pm 10 \text{ kPa}$ [60]. Our constructs with similar stiffness did not allow for a complete cell differentiation, which is why we chose to work with milder polymerization. Compared to collagen hydrogels that have elastic modulus from 2 Pa to 720 Pa [36,51,61,62] our constructs are still closer to the natural bone matrix before mineralization occurs, which make them valuable for further biomechanical studies of bone cells (figure 1).

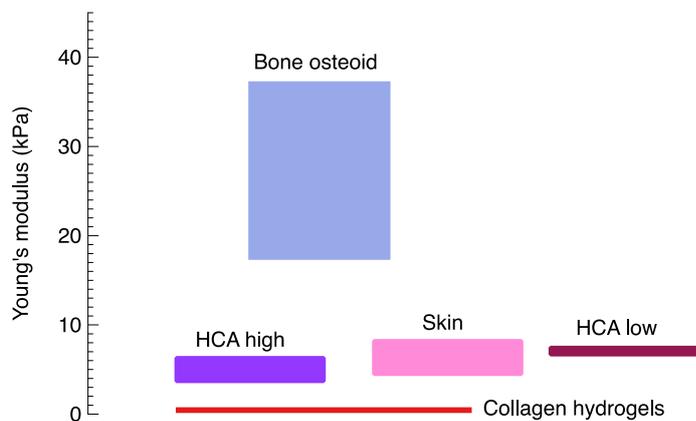


Figure 1: Comparative biomechanical properties of hydrogels: elastic modulus of collagen hydrogels, HCA_{High} and HCA_{Low}, skin and unmineralized bone matrix. HCA_{High}: hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low}: hydrogel contraction assay with low contraction.

2. Hydrogel contraction

Contraction of hydrogels was monitored over 35 days by macroscopic images (figure 2 A and E). This method has been extensively used to study cell behavior in 3D hydrogels but did not provide quantitative data about traction force generated by the cells [9,25,29,57]. Therefore, we developed a biomechanical model based on the kinetic energy theorem to quantify contraction forces from measurements of tissue construct surfaces.

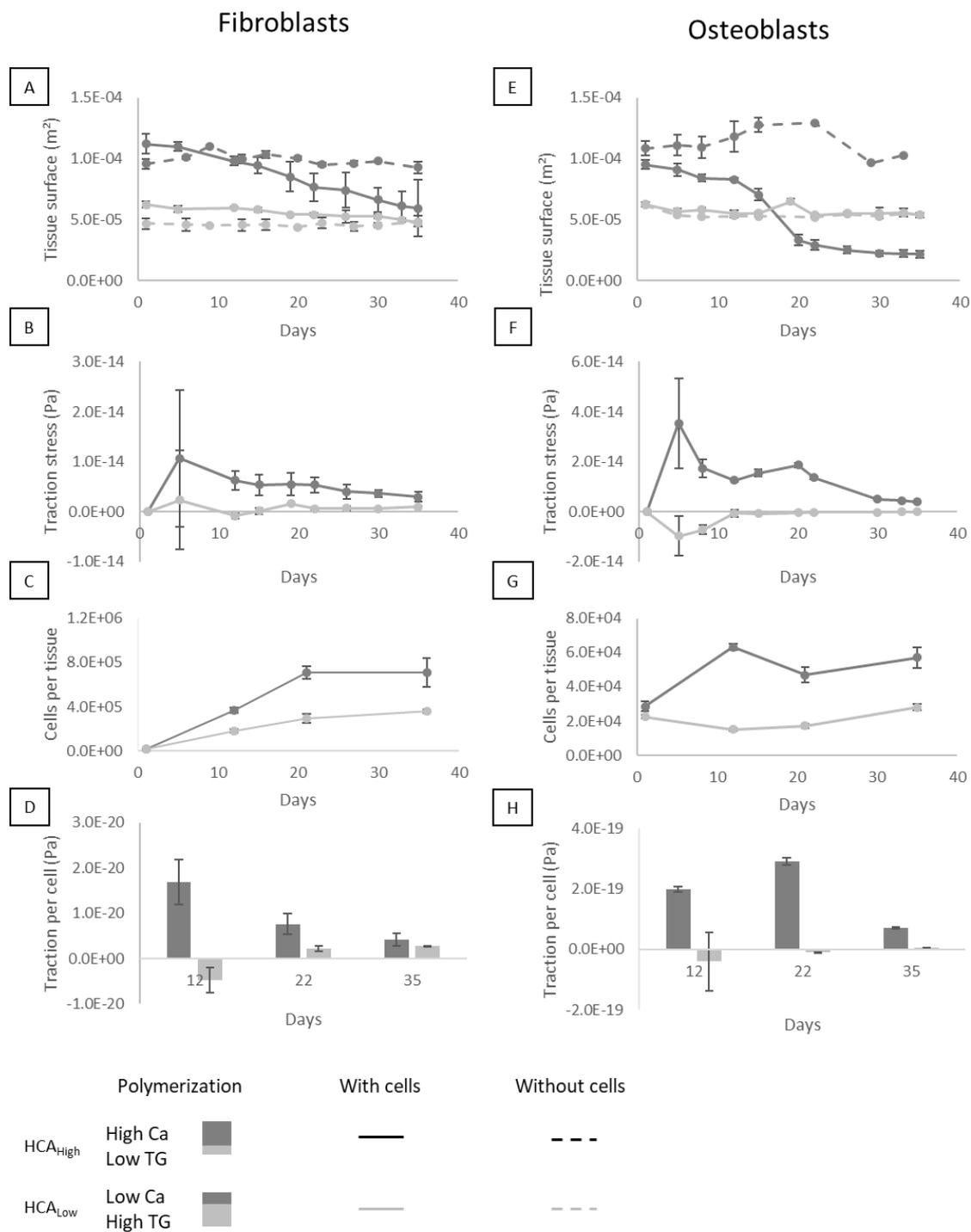


Figure 2 : Contraction of hydrogel and proliferation kinetics for dermis fibroblast and bone osteoblasts. Surface evolution of samples with fibroblasts (A) and osteoblasts (E), the corresponding generated traction stress (B, F), cell growth (C, G) and traction pressure normalized to cell number (D, H). HCA_{High}: hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low}: hydrogel contraction assay with low contraction.

Small variations in the surface of samples without cells were attributed to measurement variations and interactions between the hydrogel and the culture medium. Acellular HCA_{High} constructs degraded and collapsed within the 12 first days of incubation in either osteogenic or fibroblastic medium. We thus used the respective acellular hydrogel to normalize the tissue construct longitudinal contraction. Hydrogel contraction by both osteoblasts and fibroblasts depended on the polymerization condition.

After 35 days of culture, fibroblasts and osteoblasts had contracted their hydrogel to 47% and 77% (supplementary figure S2) respectively of their initial surface in HCA_{High} while in HCA_{Low}, the contraction was 24% for fibroblasts and 14% for osteoblasts.

To quantify the traction force generated by the cells responsible for the contraction of the hydrogels, we applied the work-energy theorem to the evolution of tissue construct surfaces.

The work-energy theorem is defined as:

$$W_{F_{ext}}^{\rightarrow} + W_{F_{int}}^{\rightarrow} = \Delta E_K \quad (1)$$

where $W_{F_{ext}}^{\rightarrow}$ is the work of the external forces, $W_{F_{int}}^{\rightarrow}$ is the work of the internal forces and ΔE_K is the studied system change of kinetic energy, namely the tissue construct. We considered that cells were mainly responsible for the contraction of the tissue construct. Consequently, the work of external forces was neglected compared to the work of internal forces: $W_{F_{ext}}^{\rightarrow} \ll W_{F_{int}}^{\rightarrow}$

Hence, we approximated the change of kinetic energy by:

$$W_{F_{int}}^{\rightarrow} = \Delta E_K \quad (2)$$

Cells produced on a small surface ds on the sidewall of the tissue a small force $d\vec{F}_{int}$ such as: $\vec{F}_{int} = -\tilde{p}ds\vec{e}_r$, where \tilde{p} is the stress applied by the cells onto the surface ds and \vec{e}_r is the radial vector in cylindrical coordinates (figure 3). In the following, we assumed that cells acted mainly on the sidewall of the tissue construct, meaning that we supposed that the height of the tissue samples h remained constant [58,63].

The work done by the internal forces $W_{F_{int}}^{\rightarrow}$ when the system moves an infinitesimal amount dr is defined as:

$$W_{F_{int}}^{\rightarrow} = \int d\vec{F}_{int} \cdot d\vec{r} = \int -\tilde{p}ds\vec{e}_r \cdot d\vec{r} = \int -\tilde{p}dsdr$$

In cylindrical coordinates, the small surface ds is expressed as: $ds = rd\theta dz$, so the work done by the internal forces is given by:

$$W_{F_{int}}^{\rightarrow} = \int -\tilde{p}rdrd\theta dz$$

We assumed that the stress applied by cells on the sidewall of the tissue was homogenous, isotropic and constant for the given period of time, hence:

$$W_{F_{int}} \rightarrow = -\tilde{p} \int_{r_0}^{r_i} r dr \int_0^{2\pi} d\theta \int_{-\frac{h}{2}}^{+\frac{h}{2}} dz = -\pi \tilde{p} h (r_i^2 - r_0^2) \quad (3)$$

Where r_i is the radius of the sample at time i and r_0 the radius of the sample at initial time.

In classical mechanics, the change of kinetic energy for a point object of mass m is given by:

$$\Delta E_K = \frac{1}{2} m v_i^2 - \frac{1}{2} m v_0^2 \quad (4)$$

where v_i^2 and v_0^2 are respectively the square of the speed at time i and initial time. In our study, a variation of the volume of biological sample has been observed as a function of time. We assumed that the radius of the sample was much higher than the height ($h \ll r$), hence, by analogy to the change of kinetic energy for a point object, we write the change of kinetic energy for our sample as:

$$\Delta E_K = \frac{1}{2} \sigma (\overline{s_i^2} - \overline{s_0^2}) \quad (5)$$

where σ is the surface mass of the sample and $\overline{s_i^2}$ and $\overline{s_0^2}$ are respectively the square of the areal speed at time i and initial time. In our study, the initial conditions involved that the areal speed at the initial time was equal to 0, so eq. 5, is rewritten as:

$$\Delta E_K = \frac{1}{2} \sigma \overline{s_i^2} \quad (6)$$

The areal speed at time i is defined as: $\overline{s_i} = \frac{s_i - s_0}{t_i - t_0}$, where s_i and s_0 are respectively the surface of the biological sample at time i , noted t_i , and initial time, noted t_0 .

The volume of the sample at t_i , is defined as: $v_i = s_i h$, and the volume of the sample at initial time t_0 is: $v_0 = s_0 h$.

As we assumed that the contraction of the tissue happened in the radial direction and that the height h of the tissue remained constant, the areal speed at time i , is then expressed as: $\overline{s_i} = \frac{1}{h} \left(\frac{v_i - v_0}{t_i - t_0} \right)$. The change of kinetic energy (Eq.6) is defined as:

$$\Delta E_K = \frac{1}{2} \frac{\sigma}{h^2} \left(\frac{v_i - v_0}{t_i - t_0} \right)^2 \quad (7)$$

The ratio $\frac{v_i - v_0}{t_i - t_0}$ is homogenous to the volume speed of the sample at time i , noted $\overline{v_i}$. Moreover, the ratio $\frac{\sigma}{h}$ is equivalent to the density of the sample, noted ρ . As a consequence, Eq.7 can be rewritten as:

$$\Delta E_K = \frac{1}{2} \frac{\rho}{h} \overline{v_i^2} \quad (8)$$

From Eq.2 using equations (3) and (8), the stress \tilde{p} applied by the cells in the tissue constructs is given by:

$$\tilde{p} = -\frac{\rho}{2\pi h^2} \frac{\overline{v_i^2}}{(r_i^2 - r_0^2)} = -\frac{\rho}{2} \frac{s_i - s_0}{(t_i - t_0)^2} \quad (9)$$

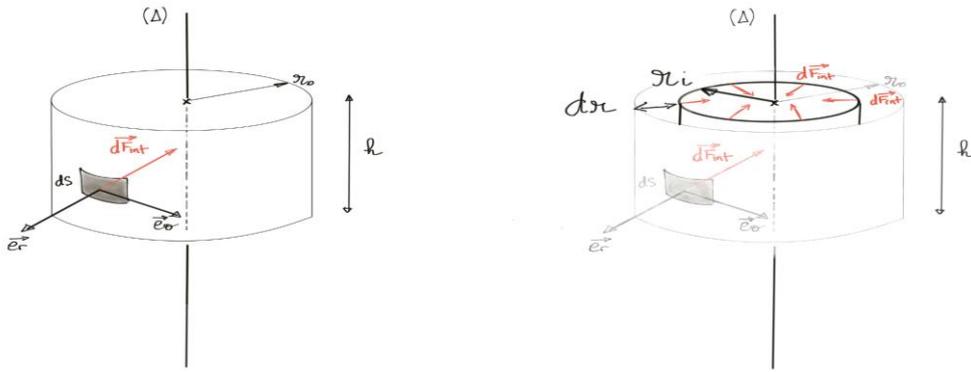


Figure 3 : Schematic representation of biprinted hydrogel a) at initial time t_0 , which corresponds to the hydrogel base state, b) at time t_i ($t_i > t_0$), which corresponds to a deformed state (volume decrease) compared to t_0 , due to the the action of cells. $\overline{dF_{int}}$ represents the cells' differential traction force acting on the differential area dS . dr is the radial displacement of the hydrogel due to the action of the cells.

Cell contraction was determined after normalization by traction stress (\bar{p}) evaluated on the respective acellular control hydrogels. HCA_{Low} did not demonstrate a significant cell traction stress over the 35 days of culture for both cell types (Figure 2 B and F). Oppositely, a positive traction stress was observed for the HCA_{High} constructs. Maximal values were reached at day 5 with $1.1 \cdot 10^{-14}$ Pa for fibroblasts and $3.5 \cdot 10^{-14}$ Pa for osteoblasts. Then, traction stress decreased over time, dropping to $3.0 \cdot 10^{-15}$ Pa for fibroblasts and to $4.0 \cdot 10^{-15}$ Pa for osteoblasts after 35 days of culture. Osteoblasts showed a temporary increase of traction stress between day 12 and 20, corresponding to the elevation of the rate of surface contraction.

To correlate traction stress to biological behavior, we first monitored the cell growth kinetics of both fibroblasts and osteoblasts. This also allowed us to calculate the specific traction, *i.e.* traction generated per cells, in both condition over time. Growth kinetics were performed thanks to tissue construct dissociation at days 12, 22 and 35.

The global increase of contraction stress was not only a consequence of an increased number of cells in the tissue construct but also an increased contractility of cells. Indeed, the specific traction generated per cell was higher for both fibroblasts and osteoblasts in HCA_{High} biomaterial than in HCA_{Low} at all time points. This difference reached $2.2 \cdot 10^{-20}$ Pa for fibroblasts at day 12 and $3.0 \cdot 10^{-19}$ Pa for osteoblasts at day 22. Interestingly, specific traction is different in magnitude and evolves differently depending on the cell origin. Osteoblasts in HCA_{High} generated 11 to 25 times higher traction stress than fibroblasts in the same condition. Specific traction of fibroblasts decreased steadily of 75% between day 12 and 35 while on the contrary osteoblasts intensified their specific traction between day 12 and 22 to later decrease again between day 22 and day 35. Past studies have already shown differences in contractile ability between cell types and species [50,64,65] and even between fibroblasts from dermis or foreskin [51].

In studies using collagen gels, most of contraction happens during the first 24h of culture then reach a plateau [25,29,40,52,58,65]. Studies using hydrogels mounted between strain gauges (cell force monitor device) demonstrated contraction forces generated by single cells in the range from 0.2nN

[50,51] to 52nN [66]. This corresponds to attachment of cells to the matrix and formation of cell cytoplasmic extension [50]. Matrix contraction values are affected by cell type, extraction method of primary cell, and localization within the tissue [50,65,67]. Contraction forces generated by periodontal ligament fibroblasts in collagen hydrogels [66] were 200 times higher than forces generated by dermal fibroblast [50]. We computed specific contraction forces generated per cells by normalization of the traction stress with the surface area. In our case, the maximum forces generated at day 5 were 0.2nN for fibroblasts and 0.7nN for osteoblasts. This fell in the lower range of values found in literature [50,51,68], which correspond to hydrogel with elastic modulus of 0.1 kPa. In our case, hydrogel elastic modulus was 6.2 kPa for fibroblasts and 3.7 kPa for osteoblasts, which was 37 to 62 times higher. As it has been shown that matrix stiffness (here defined as opposite of compliance) lowers macroscopic contraction by cells [25,68], this explains the lower specific force values that we obtained. In our case, it is likely that cell contraction is underestimated for cells in HCA_{Low} because forces generated by cells are not sufficient to induce a significant matrix contraction at the macroscopic scale. One limitation of our model is that it cannot take into account the stiffness of the hydrogel as mechanical properties of the extracellular matrix evolve over the 33 days of maturation. Another limitation of our model is that it computes only a global average of contraction stress. Maximal stress values in the vicinity of cells calculated by traction force microscopy are on the order of 1 to 10 Pa [30]. As we work at the macroscopic scale, we cannot estimate these peak values.

Differences between the two tissue constructs HCA_{High} and HCA_{Low} in term of contraction forces confirm the hypothesis that hydrogel resistance is strongly impacting contraction forces and cell behavior. Since mechanical properties at day 1 were similar between HCA_{High} and HCA_{Low}, the difference of measured contraction must come from the ability of the cells to reorganize the matrix. Polymerization with transglutaminase cross-links gelatin through $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ linkage using the side chains of lysine and glutamine residues. This enhances hydrogel resistance to proteolytic degradation [69]. It is thus likely that cells cannot remodel their surrounding matrix in hydrogels polymerized with high levels of transglutaminase. This is further supported by the fact that acellular HCA_{High} samples degraded during cultivation whereas acellular HCA_{Low} samples remained intact during the 35 days of cultivation.

II. Hydrogel biomechanical impact on cell physiological behavior

Macroscopic differences observed on generated contraction forces were linked with the characterization of cell growth profile in the matrix and with their contractile phenotypes as for example the expression of actin [22,29] and specialized contractile $\alpha\text{-SM actin}$ [35,70].

1. Cell viability and spreading

For the first time in a contraction study, the growth pattern of fibroblasts and osteoblasts were monitored by calcein-green live cell staining and cell counting after tissue constructs dissociation

(figure 2 C and G and figure 4) to follow cell proliferation trends and cell morphology within the hydrogels.

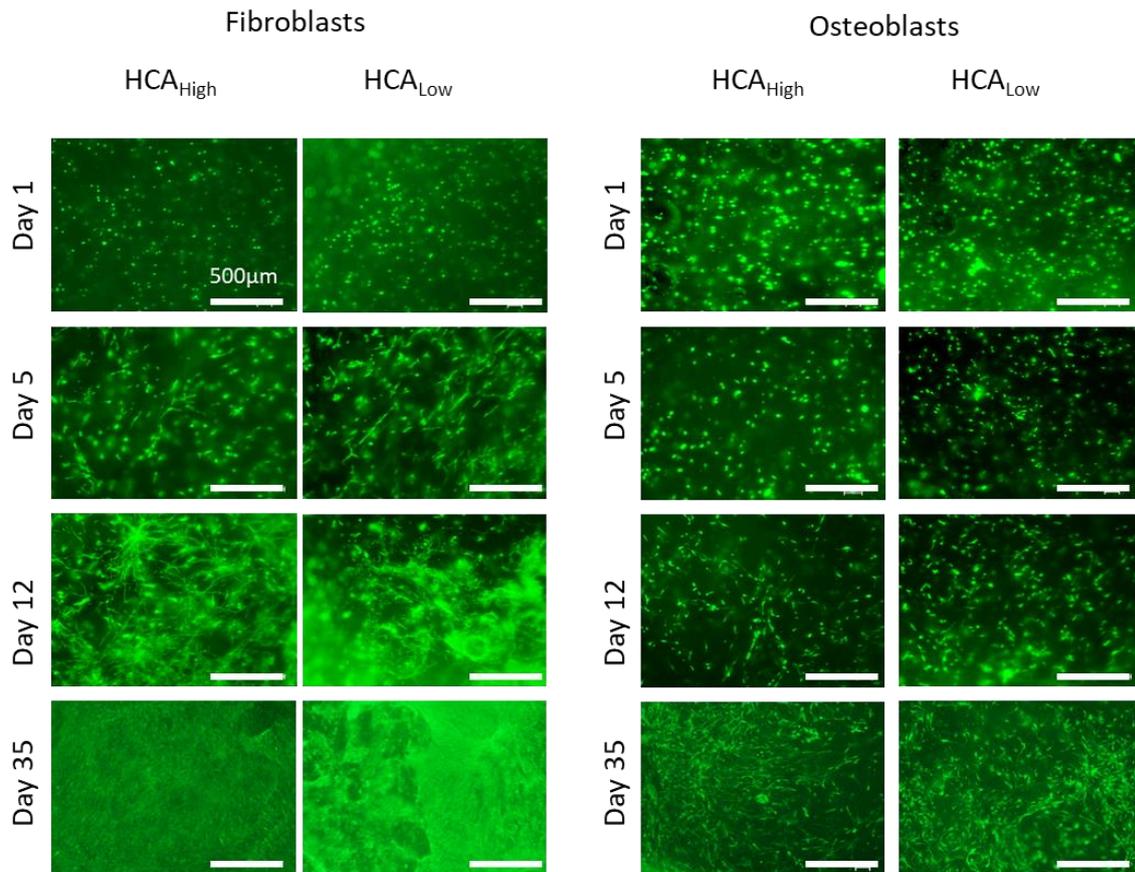


Figure 4: Longitudinal characterization of Fibroblasts and Osteoblasts growth and morphology. Microscopic imaging of live cells stained with green calcein-AM and observed with a 475 nm filter. Cells were seeded at $3.0 \cdot 10^5$ cells/mL and monitored for 35 days. Scale bar 500 μ m. HCA_{High}: hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low}: hydrogel contraction assay with low contraction.

Concerning growth kinetics, both cell types displayed increased growth rate in HCA_{High} compared to HCA_{Low}. Fibroblasts showed similar growth trends for both constructs with a linear increase until day 21, corresponding to a growth rate of 0.17 day^{-1} in HCA_{High} and 0.13 day^{-1} in HCA_{Low}. This growth was followed by a stabilization phase at a cell density 2.4 times higher in HCA_{High} than in HCA_{Low}. Cell proliferation was more limited for osteoblasts with a growth rate of 0.07 day^{-1} in HCA_{High} and no growth in HCA_{Low} conditions. Again, cell densities in HCA_{High} were 2 times higher than in HCA_{Low} after 35 days of culture.

To detail growth behaviors of both cells in these hydrogels, cells morphology and repartition were followed by live cells calcein staining. Three growth phases were identified for fibroblasts. First, within the 5 first days, fibroblasts displayed a spherical shape. From day 12 they started to stretch and demonstrated stellate shapes. An interconnected network developed and it was only after 21 days of culture that fibroblasts formed a dense layer on the construct periphery which remained until the end of the culture. Additional staining of cell nuclei with DAPI and of actin cytoskeleton with phalloidin on histological cuts revealed differences in cell repartition inside the construct depending on the polymerization condition (figure 5 and supplementary S3). Fibroblasts in HCA_{High} were well distributed throughout the hydrogel and were connected to each other through their cytoplasmic extensions while

in HCA_{Low} cells were mainly distributed on the surface of the construct with a polarized morphology. Very few cells exhibiting cytoplasmic extensions were distributed inside the construct. In both HCA_{High} and HCA_{Low} cells displayed the fibroblasts morphology described in literature for free floating hydrogels, thus confirming the phenotype of contractile cells [34].

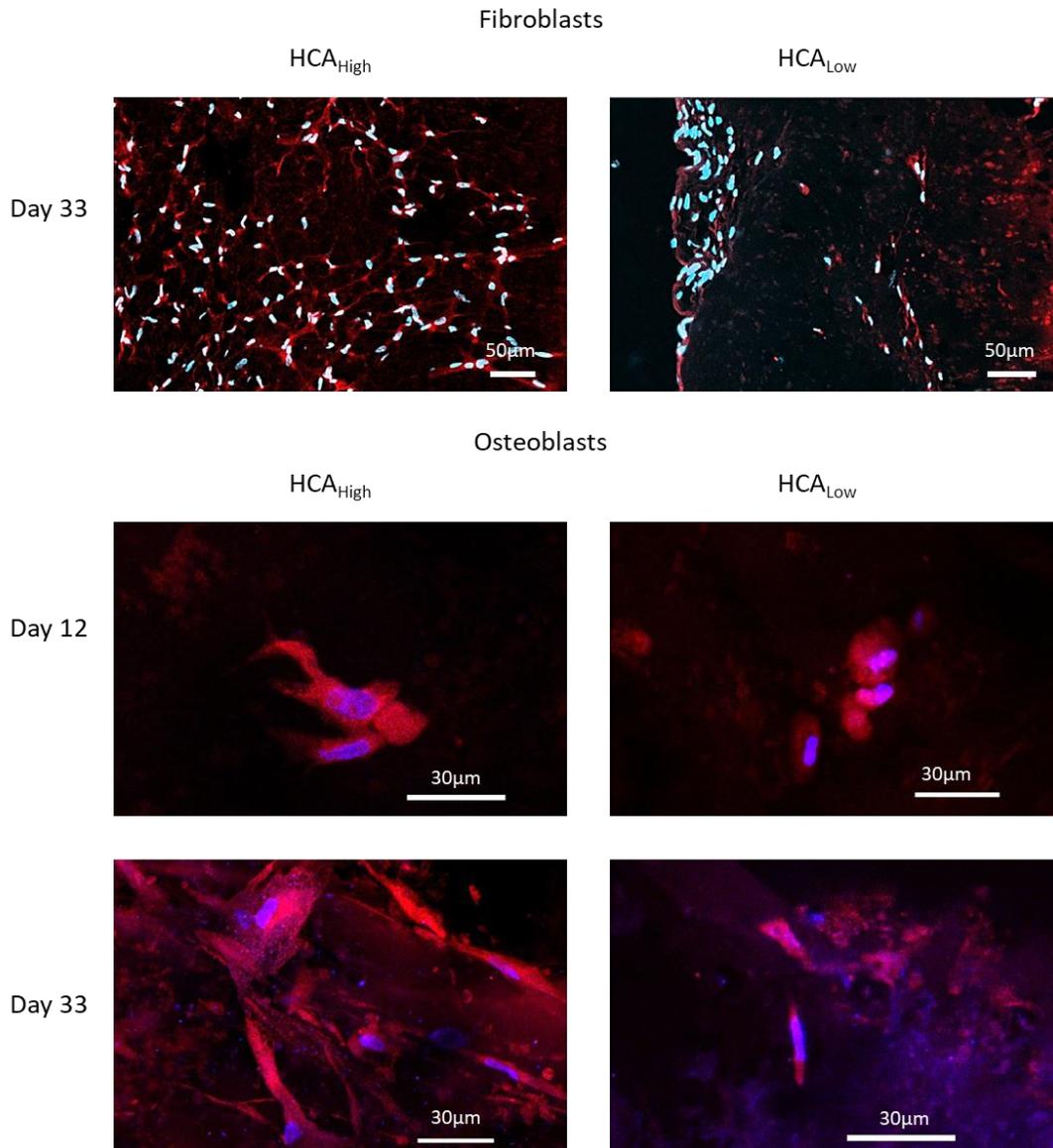


Figure 5: Morphological and Repartition analysis thanks to actin staining of fibroblasts and osteoblasts. Actin fibers were stained in with phalloidin-Alexa fluor 546 and nuclei were counterstained in blue with DAPI. Osteoblasts cells were visualized by confocal microscopy with a x40 objective. Images are maximum intensity projection of z-stack. Fibroblasts cells were imaged by a slide scanner with a x20 objective. HCA_{High}: hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low}: hydrogel contraction assay with low contraction.

Three growth phases are also visible for osteoblasts. From day 1 to day 5, osteoblasts displayed a cuboidal morphology characteristic of active cells that are not fully differentiated. From day 12, few cells initiated some dendrites. This proved the beginning of differentiation process into osteocytes. After 35 days of culture, cells formed an interconnected network through their dendrites, demonstrating a fully differentiated state into osteocytes. This was further supported by expression of osteocytic marker PHEX (supplementary S4). DAPI and phalloidin staining confirmed these assumptions. Cells exhibited a cuboidal morphology with some osteoblasts starting to extend

cytoplasmic prolongations for both conditions at day 12 (figure 4). However, after 33 days of culture, strong differences between constructs were observed. HCA_{High} demonstrated a higher internal cell density with osteocytes interconnected thanks to their dendrites. On the contrary, in the HCA_{Low} tissue constructs, cells were mostly distributed on the periphery and showed an elongated morphology with some prolongations. Besides, cells did not appear to form a dense interconnected network like for osteocytes present in the HCA_{High} constructs.

Both osteoblasts and fibroblasts reached a maximum of global traction stress at day 5. This correlated with attachment of cells (see figure 2 day 5). This is also relevant with maximal contraction in collagen gels during the attachment phase of the cells [50,64].

2. Expression of α -SMA

Cell contractile phenotype is identified thanks to the detection of α -SMA fibers. Thus, expression of α -SMA fibers was compared for both cells in HCA_{High} and HCA_{Low} conditions. Both fibroblasts and osteoblasts in HCA_{High} condition expressed α -SMA associated with a strong contraction of the biomatrix (47% and 77% respectively). A clear biomatrix remodeling was also observed when compared with HCA_{Low} and was further confirmed by collagen staining (supplementary S5). Interestingly, both osteoblasts and fibroblasts also expressed α -SMA in HCA_{Low}. This proved that cells in HCA_{High} and HCA_{Low} presented a contractile behavior. However, as cells reached a lower density in HCA_{Low} than in HCA_{High} and were distributed mainly on the construct perimeter, contraction occurred only on the hydrogel periphery. In contrast, cells in HCA_{High} applied contraction forces homogeneously on the overall construct volume.

Thanks to labelling of α -SMA fibers, we confirmed fibroblasts transition to myofibroblasts described in wound contraction. This behavior is generally initiated by surrounding fibroblasts migration to the wound and is described as a mechanism which stiffened the ECM [34].

As for osteoblasts seeded hydrogels, we identified several transition phases for cell phenotypes through expression of α -SMA fibers. Expression of α -SMA by osteoblasts has already been demonstrated both *in vitro* and *in vivo* [26,37,71]. Active osteoblastic cells involved in fracture repair express α -SMA fibers while it is no longer the case for mature osteocytes. This is consistent with the observed behavior in our experiment with a proliferation phase occurring during the first 12 days when cells exhibited expression α -SMA fibers and generated high cell specific contraction (figure 2 and 6), while the second growth phase until 35 days of culture demonstrated an osteocyte phenotype and a stabilization of contraction forces.

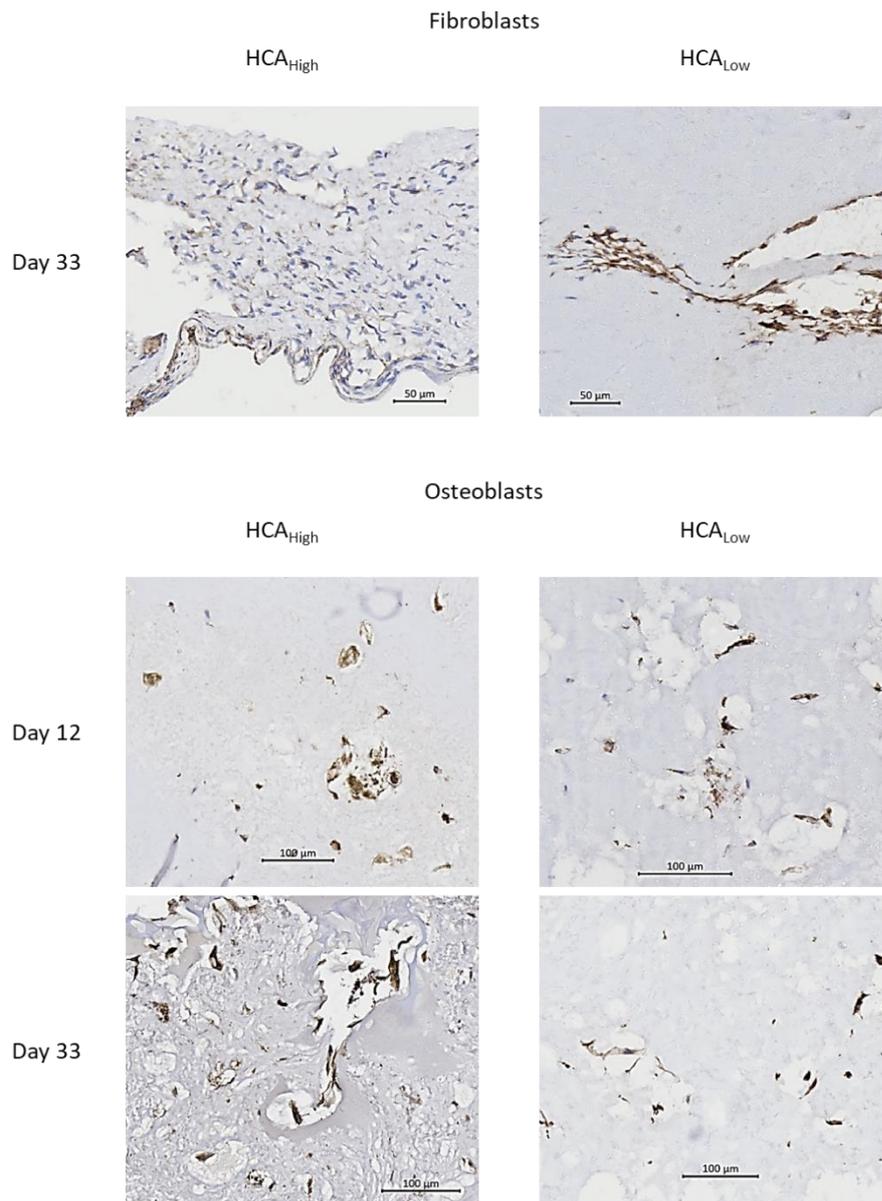


Figure 6: Contractile α -SMA fiber immunostaining for constructs seeded with fibroblasts and osteoblasts. Cells expressing α -SMA are visualized in brown after HRP revelation while cell nuclei are visualized with a counterstaining with Gill's Hematoxylin in dark blue. HCA_{High}: hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low}: hydrogel contraction assay with low contraction.

An advantage of our study compared to the ones presented in literature is the monitoring of contraction forces over long cultivation periods - 35 days in the present case. This allowed us to clearly identify different cellular processes involved in biomatrix contraction. Cell growth was only characterized over the first 21 days of culture for fibroblasts and 12 days for osteoblasts. This meant that novel cell attachment could not account for the contraction occurring after the growth phases. Expression of α -SMA suggested a shift of contraction mode from cell attachment and locomotion to cell shortening. Cells in HCA_{High} generated specific contraction stress an order of magnitude higher than in HCA_{Low} but no differences were noticed in contractile phenotype of the cells. This indicated that hydrogel resisted to cell contraction forces. As contraction depends on cell density [25,36], cells in HCA_{High} probably did not reach the density threshold to initiate contraction. To verify such hypothesis,

further experiments should investigate the effect of a higher seeding cell density on the construct contraction.

III. Conclusion

This study proposes a new method to quantify traction forces generated by cells embedded in hydrogels. This biomechanical model is non-destructive and requires only macroscopic images of the seeded hydrogels and allows for long term longitudinal monitoring of several contractile cell processes. Two contractile cells were studied, fibroblasts and osteoblasts embedded in proliferative hydrogels, over 35 days. Differential reticulation process confers to the selected hydrogels modulable mechanical properties and degradability by cells MMP's. It was possible to enhance cell proliferation and their contractile fibers expression to observe a strong matrix contraction by the cells (up to 50% for fibroblasts and 75% for osteoblasts). On the contrary, the choice of a matrix presenting increased reticulation of the hydrogels, thus impeding cell proliferation, also limited the overall expression of cell contractile fibers and macroscopic observation of such biological function. Future studies should focus on solutions to take into account anisotropy of the traction stress that arises locally inside the hydrogels.

SUPPLEMENTARY DATA

S1: Surface measurement of bioprinted constructs. Surfaces of the construct (continuous line) and culture well (dashed line) have been measured in pixels. The known area in cm^2 of the culture well has been used to convert the construct area in cm^2 . HCA_{High} : hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low} : hydrogel contraction assay with low contraction.

S2: Evolution of hydrogel surface monitored by image analysis expressed as a percentage of surface value at day 1. HCA_{High} : hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low} : hydrogel contraction assay with low contraction.

S3: Repartition of fibroblasts at day 33. Dashed line delineates the perimeter of the tissue construct. Nuclei were stained with DAPI and appear in blue. HCA_{High} : hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low} : hydrogel contraction assay with low contraction.

S4: Expression of PHEX revealing differentiation from osteoblasts to osteocytes at day 33. Cells expressing PHEX appear in brown after HRP revelation while cell nuclei are visualized with a counterstaining with Gill's Hematoxylin in dark blue. HCA_{High} : hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low} : hydrogel contraction assay with low contraction.

S5: Collagen secretion by osteoblasts at day 33. Collagen appear in brown after immunostaining and revelation by HRP. Osteoblasts in HCA_{High} have remodeled their matrix and secreted a dense collagen matrix while secretion of collagen in HCA_{Low} is localised immediately around cells. HCA_{High} : hydrogel contraction assay with high contraction, HCA_{Low} : hydrogel contraction assay with low contraction.

REFERENCES

- [1] Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechetoille N, et al. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *European Journal of Dermatology* 2009;19:107–13. <https://doi.org/10.1684/ejd.2008.0573>.
- [2] Boyce S, Supp D. Chapter 11 - Biologic Skin Substitutes. In: Albanna MZ, Holmes IV JH, editors. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Boston: Academic Press; 2016, p. 211–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801654-1.00011-5>.
- [3] Black AF, Bouez C, Perrier E, Schlotmann K, Chapuis F, Damour O. Optimization and Characterization of an Engineered Human Skin Equivalent. *Tissue Engineering* 2005;11:723–33. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.723>.
- [4] Hu K, Shi H, Zhu J, Deng D, Zhou G, Zhang W, et al. Compressed collagen gel as the scaffold for skin engineering. *Biomed Microdevices* 2010;12:627–35. <https://doi.org/10.1007/s10544-010-9415-4>.
- [5] Bosetti M, Borrone A, Leigh M, Shastri VP, Cannas M. Injectable Graft Substitute Active on Bone Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part A* 2017;23:1413–22. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0554>.
- [6] Witt F, Duda GN, Bergmann C, Petersen A. Cyclic Mechanical Loading Enables Solute Transport and Oxygen Supply in Bone Healing: An In Vitro Investigation. *Tissue Engineering Part A* 2013;20:486–93. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0678>.
- [7] Eastwood M, Mudera VC, Mcgrouther DA, Brown RA. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: Morphological changes. *Cell Motility* 1998;40:13–21. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1998\)40:1<13::AID-CM2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1998)40:1<13::AID-CM2>3.0.CO;2-G).
- [8] Branco da Cunha C, Klumpers DD, Li WA, Koshy ST, Weaver JC, Chaudhuri O, et al. Influence of the stiffness of three-dimensional alginate/collagen-I interpenetrating networks on fibroblast biology. *Biomaterials* 2014;35:8927–36. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.047>.
- [9] Grinnell F, Ho C-H. Transforming Growth Factor β Stimulates Fibroblast–Collagen Matrix Contraction by Different Mechanisms in Mechanically Loaded and Unloaded Matrices. *Experimental Cell Research* 2002;273:248–55. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5445>.
- [10] Dos Santos M, Metral E, Boher A, Rousselle P, Thepot A, Damour O. In vitro 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis aging. *Matrix Biology* 2015;47:85–97. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.009>.
- [11] Claus S, Fischer J, Mégarbané H, Mégarbané A, Jobard F, Debret R, et al. A p.C217R Mutation in Fibulin-5 from Cutis Laxa Patients Is Associated with Incomplete Extracellular Matrix Formation in a Skin Equivalent Model. *Journal of Investigative Dermatology* 2008;128:1442–50. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701211>.
- [12] Ibañez RIR, do Amaral RJFC, Reis RL, Marques AP, Murphy CM, O’Brien FJ. 3D-Printed Gelatin Methacrylate Scaffolds with Controlled Architecture and Stiffness Modulate the Fibroblast Phenotype towards Dermal Regeneration. *Polymers* 2021;13:2510. <https://doi.org/10.3390/polym13152510>.
- [13] Akiva A, Melke J, Ansari S, Liv N, Meijden R van der, Erp M van, et al. An Organoid for Woven Bone. *Advanced Functional Materials* 2021;n/a:2010524. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010524>.
- [14] Naqvi SM, Panadero Pérez JA, Kumar V, Verbruggen ASK, McNamara LM. A Novel 3D Osteoblast and Osteocyte Model Revealing Changes in Mineralization and Pro-osteoclastogenic Paracrine Signaling During Estrogen Deficiency. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00601>.
- [15] Pourchet LJ, Thepot A, Albouy M, Courtial EJ, Boher A, Blum LJ, et al. Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Advanced Healthcare Materials* 2017;6:1601101. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601101>.
- [16] Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective Tissues: Matrix Composition and Its Relevance to Physical Therapy. *Physical Therapy* 1999;79:308–19. <https://doi.org/10.1093/ptj/79.3.308>.

- [17] Brown RA. In the beginning there were soft collagen-cell gels: towards better 3D connective tissue models? *Experimental Cell Research* 2013;319:2460–9. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.07.001>.
- [18] Bernhardt A, Weiser E, Wolf S, Vater C, Gelinsky M. Primary Human Osteocyte Networks in Pure and Modified Collagen Gels. *Tissue Engineering Part A* 2019;25:1347–55. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0338>.
- [19] Eyre D. Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 2001;4:30. <https://doi.org/10.1186/ar380>.
- [20] Franchi M, Trirè A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen Structure of Tendon Relates to Function. *TheScientificWorldJOURNAL* 2007;7:404–20. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.92>.
- [21] Tschumperlin DJ. Fibroblasts and the Ground They Walk On. *Physiology* 2013;28:380–90. <https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2013>.
- [22] Grinnell F, Petroll WM. Cell Motility and Mechanics in Three-Dimensional Collagen Matrices. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2010;26:335–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113318>.
- [23] Yu Z, Liu K-K. Soft Polymer-Based Technique for Cellular Force Sensing. *Polymers* 2021;13:2672. <https://doi.org/10.3390/polym13162672>.
- [24] Boys AJ, Owens RM. Measuring cellular contraction: Current progress and a future in bioelectronics. *APL Materials* 2021;9:040903. <https://doi.org/10.1063/5.0040953>.
- [25] Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1979;76:1274–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.3.1274>.
- [26] Kinner B, Spector M. Expression of smooth muscle actin in osteoblasts in human bone. *Journal of Orthopaedic Research* 2002;20:622–32. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(01\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00145-0).
- [27] Kim AC, Spector M. Distribution of chondrocytes containing α -smooth muscle actin in human articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 2000;18:749–55. <https://doi.org/10.1002/jor.1100180511>.
- [28] Schulz Torres D, M. Freyman T, Yannas IV, Spector M. Tendon cell contraction of collagen–GAG matrices in vitro: effect of cross-linking. *Biomaterials* 2000;21:1607–19. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00051-X).
- [29] Parreno J, Buckley-Herd G, de-Hemptinne I, Hart DA. Osteoblastic MG-63 cell differentiation, contraction, and mRNA expression in stress-relaxed 3D collagen I gels. *Mol Cell Biochem* 2008;317:21. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9801-x>.
- [30] Steinwachs J, Metzner C, Skodzek K, Lang N, Thievensen I, Mark C, et al. Three-dimensional force microscopy of cells in biopolymer networks. *Nat Methods* 2016;13:171–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3685>.
- [31] Hinz B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology* 2007;127:526–37. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700613>.
- [32] Ehrlich HP, Rajaratnam JBM. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: An in vitro model of wound contraction. *Tissue and Cell* 1990;22:407–17. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(90\)90070-P](https://doi.org/10.1016/0040-8166(90)90070-P).
- [33] Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *CCID* 2014;7:301–11. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>.
- [34] Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *Journal of Cell Biology* 1994;124:401–4. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.401>.
- [35] Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Mol Biol Cell* 2001;12:2730–41.
- [36] Fernandez P, Bausch AR. The compaction of gels by cells: a case of collective mechanical activity. *Integrative Biology* 2009;1:252–9. <https://doi.org/10.1039/b822897c>.
- [37] Kinner B, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Spector M. Expression of smooth muscle actin in connective tissue cells participating in fracture healing in a murine model. *Bone* 2002;30:738–45. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00695-6](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00695-6).

- [38] Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med* 2009;41:858–65. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.12.096>.
- [39] Eldsdale T, Bard J. COLLAGEN SUBSTRATA FOR STUDIES ON CELL BEHAVIOR. *Journal of Cell Biology* 1972;54:626–37. <https://doi.org/10.1083/jcb.54.3.626>.
- [40] Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986;38:143–54. <https://doi.org/10.1007/BF02556874>.
- [41] Bowman NN, Donahue HJ, Ehrlich HP. Gap Junctional Intercellular Communication Contributes to the Contraction of Rat Osteoblast Populated Collagen Lattices. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998;13:1700–6. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.11.1700>.
- [42] Harris AK, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 1981;290:249–51. <https://doi.org/10.1038/290249a0>.
- [43] Pelham RJ, Wang Y. High Resolution Detection of Mechanical Forces Exerted by Locomoting Fibroblasts on the Substrate. *MBoC* 1999;10:935–45. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.4.935>.
- [44] Tan JL, Tien J, Pirone DM, Gray DS, Bhadriraju K, Chen CS. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *PNAS* 2003;100:1484–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0235407100>.
- [45] Bloom RJ, George JP, Celedon A, Sun SX, Wirtz D. Mapping Local Matrix Remodeling Induced by a Migrating Tumor Cell Using Three-Dimensional Multiple-Particle Tracking. *Biophysical Journal* 2008;95:4077–88. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.132738>.
- [46] Paillet-Mattei C, Laquière L, Debret R, Tupin S, Aimond G, Sommer P, et al. Rheological behaviour of reconstructed skin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2014;37:251–63. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.05.030>.
- [47] Wenz A, Janke K, Hoch E, Tovar GEM, Borchers K, Kluger PJ. Hydroxyapatite-modified gelatin bioinks for bone bioprinting. *BioNanoMaterials* 2016;17:179–84. <https://doi.org/10.1515/bnm-2015-0018>.
- [48] Legant WR, Miller JS, Blakely BL, Cohen DM, Genin GM, Chen CS. Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nat Methods* 2010;7:969–71. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1531>.
- [49] Eastwood M, McGrouther DA, Brown RA. A culture force monitor for measurement of contraction forces generated in human dermal fibroblast cultures: evidence for cell-matrix mechanical signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1994;1201:186–92. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(94)90040-X).
- [50] Eastwood M, Porter R, Khan U, McGrouther G, Brown R. Quantitative analysis of collagen gel contractile forces generated by dermal fibroblasts and the relationship to cell morphology. *Journal of Cellular Physiology* 1996;166:33–42. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199601\)166:1<33::AID-JCP4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199601)166:1<33::AID-JCP4>3.0.CO;2-H).
- [51] Karamichos D, Brown R a., Muder V. Collagen stiffness regulates cellular contraction and matrix remodeling gene expression. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2007;83A:887–94. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31423>.
- [52] Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, Gibson LJ. Fibroblast contraction of a collagen–GAG matrix. *Biomaterials* 2001;22:2883–91. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00034-5).
- [53] Blackstone BN, Powell HM. Morphogenesis and Biomechanics of Engineered Skin Cultured Under Uniaxial Strain. *Advances in Wound Care* 2012;1:69–74. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0345>.
- [54] George EL, Truesdell SL, Magyar AL, Saunders MM. The effects of mechanically loaded osteocytes and inflammation on bone remodeling in a bisphosphonate-induced environment. *Bone* 2019;127:460–73. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.07.008>.
- [55] Pourchet L, Petiot E, Loubière C, Olmos E, Dos Santos M, Thépot A, et al. Large 3D bioprinted tissue: Heterogeneous perfusion and vascularization. *Bioprinting* 2019;13:e00039. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2018.e00039>.

- [56] Marquette C, Pourchet L, Thepot A, Dos Santos M. Method for Manufacturing Body Substitutes by Additive Deposition, 2017.
- [57] Ahearne M. Introduction to cell–hydrogel mechanosensing. *Interface Focus* 2014;4:20130038. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0038>.
- [58] Jin T, Li L, Siow RCM, Liu K-K. A novel collagen gel-based measurement technique for quantitation of cell contraction force. *Journal of The Royal Society Interface* 2015;12:20141365. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.1365>.
- [59] Pailler-Mattei C, Bec S, Zahouani H. In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. *Medical Engineering & Physics* 2008;30:599–606. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2007.06.011>.
- [60] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 2006;126:677–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- [61] Nasello G, Alamán-Díez P, Schiavi J, Pérez MÁ, McNamara L, García-Aznar JM. Primary Human Osteoblasts Cultured in a 3D Microenvironment Create a Unique Representative Model of Their Differentiation Into Osteocytes. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00336>.
- [62] Movilla N, Borau C, Valero C, García-Aznar JM. Degradation of extracellular matrix regulates osteoblast migration: A microfluidic-based study. *Bone* 2018;107:10–7. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.10.025>.
- [63] Yu Z, Smith MJ, Siow RCM, Liu K-K. Ageing modulates human dermal fibroblast contractility: Quantification using nano-biomechanical testing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2021;1868:118972. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118972>.
- [64] Bellows CG, Melcher AH, Aubin JE. Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from periodontal ligament, gingiva and bone suggest functional differences between cell types. *Journal of Cell Science* 1981;50:299–314. <https://doi.org/10.1242/jcs.50.1.299>.
- [65] Delvoe Pierre, Wiliquet Philippe, Levêque J-Luc, Nusgens BV, Lapière CM. Measurement of Mechanical Forces Generated by Skin Fibroblasts Embedded in a Three-Dimensional Collagen Gel. *Journal of Investigative Dermatology* 1991;97:898–902. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12491651>.
- [66] Kasugai S, Suzuki S, Shibata S, Yasui S, Amano H, Ogura H. Measurements of the isometric contractile forces generated by dog periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Archives of Oral Biology* 1990;35:597–601. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90025-6).
- [67] Fujimura T, Hotta M, Kitahara T, Takema Y. Loss of contraction force in dermal fibroblasts with aging due to decreases in myosin light chain phosphorylation enzymes. *Archives of Pharmacol Research* 2011;34:1015–22. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0619-9>.
- [68] Jin T, Li L, Siow RC, Liu K-K. Collagen matrix stiffness influences fibroblast contraction force. *Biomed Phys Eng Express* 2016;2:047002. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/2/4/047002>.
- [69] Chau DYS, Collighan RJ, Verderio EAM, Addy VL, Griffin M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials* 2005;26:6518–29. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.017>.
- [70] Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990;63:21–9.
- [71] Kinner B, Pacicca DM, Gerstenfeld LC, Lee CA, Einhorn TA, Spector M. Expression of smooth muscle actin in cells involved in distraction osteogenesis in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research* 2003;21:20–7. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00088-8).

Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'action des cellules sur les construits. Dans un premier temps, nous avons montré qu'il était nécessaire d'appliquer une fonction de correction de l'effet du substrat pour calculer le module d'élasticité des construits dont les modules d'élasticité étaient inférieurs à 2 kPa. Nous avons ensuite appliqué un modèle viscoélastique pour exploiter les mêmes essais d'indentation. La méthode présentée a permis d'obtenir des paramètres viscoélastiques similaires à ceux obtenus lors d'un essai de relaxation, ici les modules d'élasticité instantané et à l'équilibre, ainsi que le temps de relaxation, tout en s'affranchissant des contraintes liées à ces essais.

Dans un second temps, nous avons proposé un modèle biomécanique permettant d'estimer les forces de traction générées par les cellules sur leur environnement. Ce modèle biomécanique est non destructif et nécessite uniquement des images macroscopiques des construits. Cela nous a permis de réaliser la cinétique des forces de contraction des cellules durant toute la durée de la culture (35 jours).

Chapitre 7

Développement de modèles cellulaires porteurs d'une mutation associée à l'ostéogenèse imparfaite

Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons identifié les propriétés mécaniques et structurales optimales des construits bio-imprimés pour la bio-fabrication de modèles *in vitro* de derme et de tissu osseux. Il s'agit donc pour la suite de sélectionner les cellules d'os et de derme qui possèdent une mutation génétique associée à l'ostéogenèse imparfaite (OI). Pour cela, nous avons mené deux stratégies en parallèle : d'une part, l'obtention de cellules primaires extraites des tissus de patient atteints d'OI, et d'autre part l'édition génétique de cellules saines pour reproduire une mutation associée à l'OI (figure 7.1).

L'objectif à terme est de produire des modèles *in vitro* 3D à partir de ces cellules afin de mettre en évidence les effets des mutations génétiques sur les propriétés mécaniques des construits bio-imprimés.

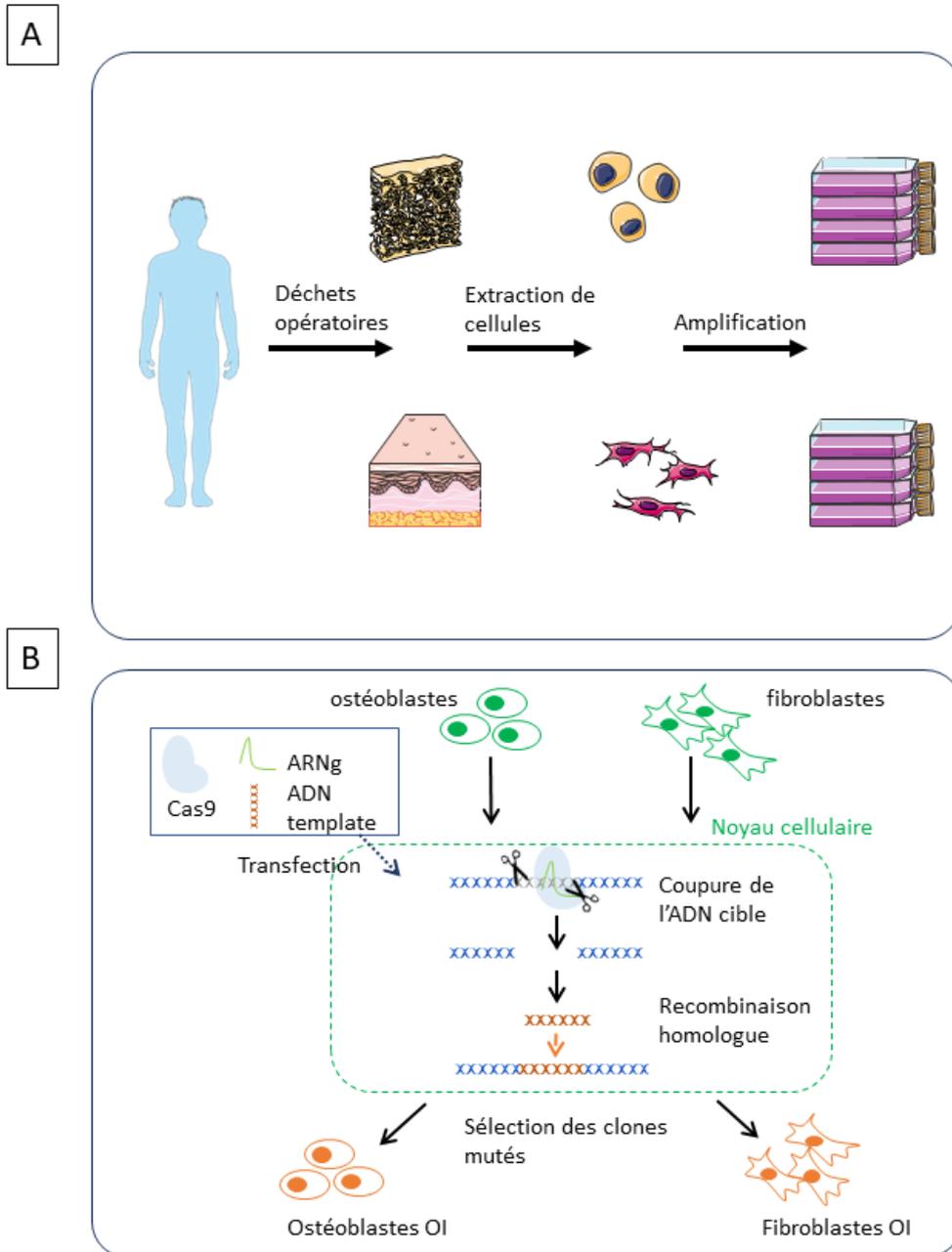


FIGURE 7.1 – Stratégies d’obtention de cellules porteuses d’une mutation associée à l’OI. A : Extraction de cellules primaires porteuses d’une mutation spontanée à partir de déchets opératoires d’os et de peau de patients OI. B : Induction d’une mutation dans des cellules contrôles par la méthode CRISPR/Cas9.

7.1 Obtention de cellules de patient : mutation spontanée

En France, l'autorisation de réaliser des études impliquant des personnes humaines nécessite la soumission d'un dossier à destination d'un comité de protection des personnes (CPP). Ce type de dossier décrit les objectifs et le déroulement de l'étude, les critères d'inclusion des participants, la balance bénéfice/risque pour les personnes incluses dans l'étude, ainsi que les données qui seront recueillies, leurs analyses et leur conservation. Afin de recruter des patients OI, nous avons collaboré avec le Pr. Roland Chapurlat des Hospices Civils de Lyon, porteur d'une étude sur l'expression sérique des micro ARN chez les patients OI. Nous avons ajouté une étude annexe au projet principal pour obtenir des déchets opératoires de peau et d'os.

Il s'agit d'une étude descriptive transversale comparant les propriétés mécaniques de la matrice organique sécrétée par les cellules cutanées et osseuses dans 2 groupes de sujets : atteints d'OI et contrôles.

Les critères d'inclusion des sujets que nous avons déterminés sont les suivants :

- population contrôle : 8 patients hommes et femmes âgés de moins de 50 ans devant subir une intervention chirurgicale programmée en orthopédie pour reconstruction des ligaments croisés ou toute intervention touchant les membres inférieurs ou supérieurs,
- population OI : 8 patients devant subir une intervention chirurgicale programmée sur les os longs, en lien avec leur pathologie.

Notre étude comporte deux parties (figure 7.2). Premièrement, lors de l'opération chirurgicale, un prélèvement cutané (13 mm^2) sera réalisé sur le site de la chirurgie et les déchets osseux post-opératoires seront récupérés. Les cellules osseuses (ostéoblastes) et de dermiques (fibroblastes) extraites des prélèvements seront utilisées pour la production de modèles *in vitro* qui serviront à comparer les propriétés mécaniques des deux tissus dans les groupes OI et contrôle. Les extractions de fibroblastes seront réalisées en partenariat avec LabSkin Creations qui a développé une expertise dans la création de modèles *in vitro* de peau. Les extractions d'ostéoblastes utiliseront un protocole de culture d'explant, tel que décrit dans le chapitre 1, section 1.1.3.2. Dans un deuxième temps, des mesures non invasives des propriétés mécaniques de la peau *in vivo* seront réalisées sur les mêmes patients pour rechercher des marqueurs non invasifs de la qualité du collagène. Le dispositif utilisé pour ces mesures est un système d'indentation sans contact développé au LTDS [345].

A ce jour, aucun patient correspondant aux critères d'inclusion n'a pu être recruté durant le temps de l'étude. En effet, l'étude ne portait que sur des patients adultes. L'OI étant une maladie rare dont la sévérité des symptômes diminue à l'âge adulte, il est probable que le recrutement de patients OI serait plus rapide en proposant une étude chez les enfants. Ceci n'a pas été possible dans le cadre de cette thèse car les pathologies infantile ne sont pas prises en charge au sein du même hôpital.

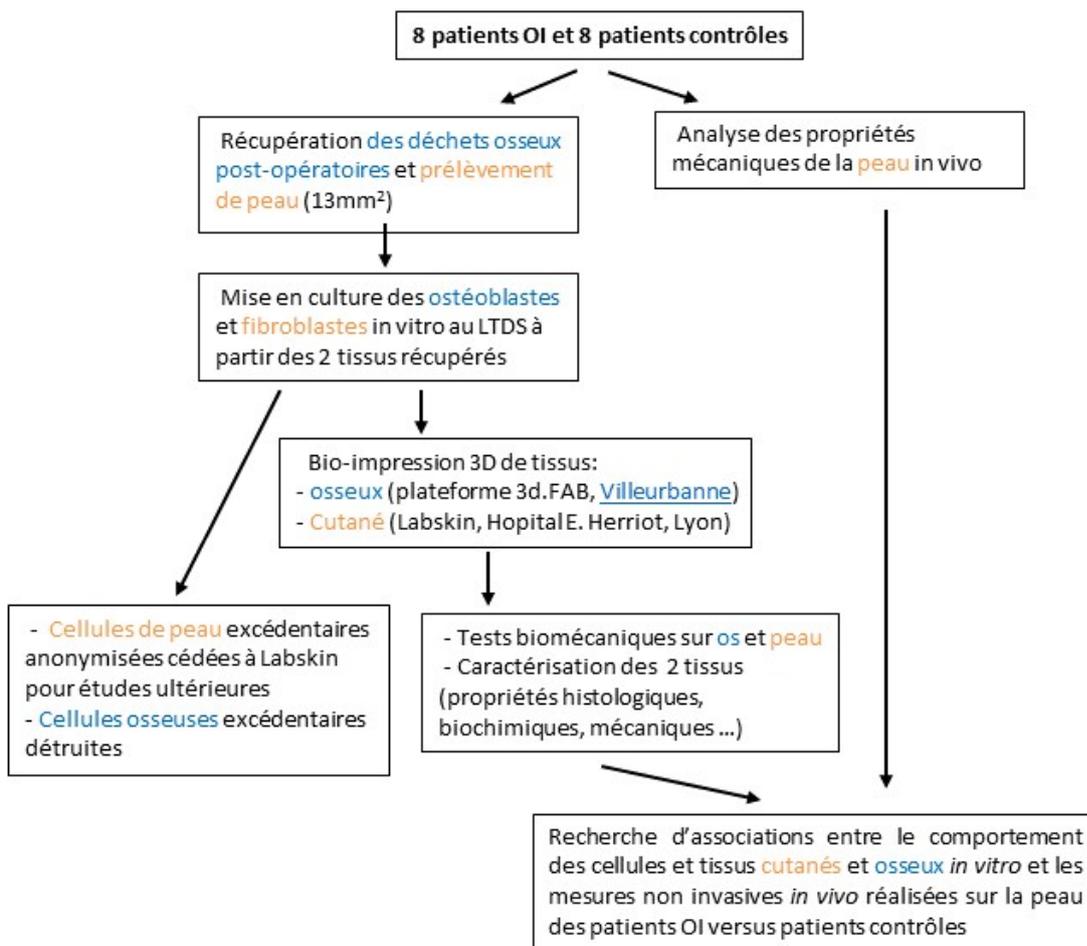


FIGURE 7.2 – Déroulement prévu de l'étude sur des patients OI et contrôles.

7.2 Edition génétique : mutation induite

Étant donné le nombre de mutations génétiques différentes et la variété de symptômes associés, il est nécessaire de décrire les mutations génétiques des individus donneurs afin d’appréhender leur impact. De plus, d’un donneur à l’autre les mutations génétiques n’ont pas nécessairement les mêmes conséquences à cause des régulations épigénétiques qui diffèrent entre les individus [179]. C’est pourquoi, en parallèle à la collecte de cellules OI issues de patients, il a été choisi de générer par ingénierie génétique une population cellulaire exprimant des mutations associées à l’OI. Ainsi, la seule différence entre les cellules OI et contrôles proviendra de la mutation. La technologie d’édition du génome CRISPR/Cas9 a été identifiée pour induire ce type de mutations à la fois dans les fibroblastes et les ostéoblastes humains. Nous avons sélectionné les lignées cellulaires ainsi que la stratégie d’édition génétique. Les analyses bio-informatiques ainsi que les manipulations génétiques nécessaires à l’établissement de ces deux modèles cellulaires (figure 7.3) ont été sous-traitées à la société genOway, spécialiste de l’édition du génome.

7.2.1 Sélection de la mutation et de la stratégie d’édition génétique

Afin de reproduire une mutation identifiée chez les patients OI, nous avons choisi de considérer uniquement les mutations portées par *COL1A1* ou *COL1A2*. En effet, ces mutations représentent environ 85 % des mutations observées chez les patients [176]. Parmi ces mutations, la substitution d’une glycine par un autre acide aminé est la mutation la plus fréquente et celle qui provoque les symptômes les plus sévères à cause de la perturbation de l’enroulement de la chaîne de collagène engendrée [176, 184]. En prérequis, la validation de ce choix est basée sur plusieurs études démontrant que l’inactivation de *COL1A1* (*knock out*, abrégé KO) peut ralentir la prolifération, mais n’affecte pas la viabilité des cellules [231, 346]. La modification du gène ne devrait donc pas impacter la viabilité cellulaire.

Afin d’identifier les mutations génétiques responsables des substitutions des glycines, la base de données *Osteogenesis Imperfecta Variant Database* a été utilisée [347]. Les critères de sélection entrés dans la base de données étaient les suivants :

- Disease : OI
- Legacy change : Gly
- Mutation effect : missense

Avec ces critères, 258 résultats sont disponibles pour *COL1A1* et 226 pour *COL1A2*. Parmi cette liste, 5 mutations majoritairement associés à des phénotypes d’OI III (la forme la plus sévère compatible avec la vie) ont été retenues pour *COL1A1* et 4 pour *COL1A2* (tableau 7.1).

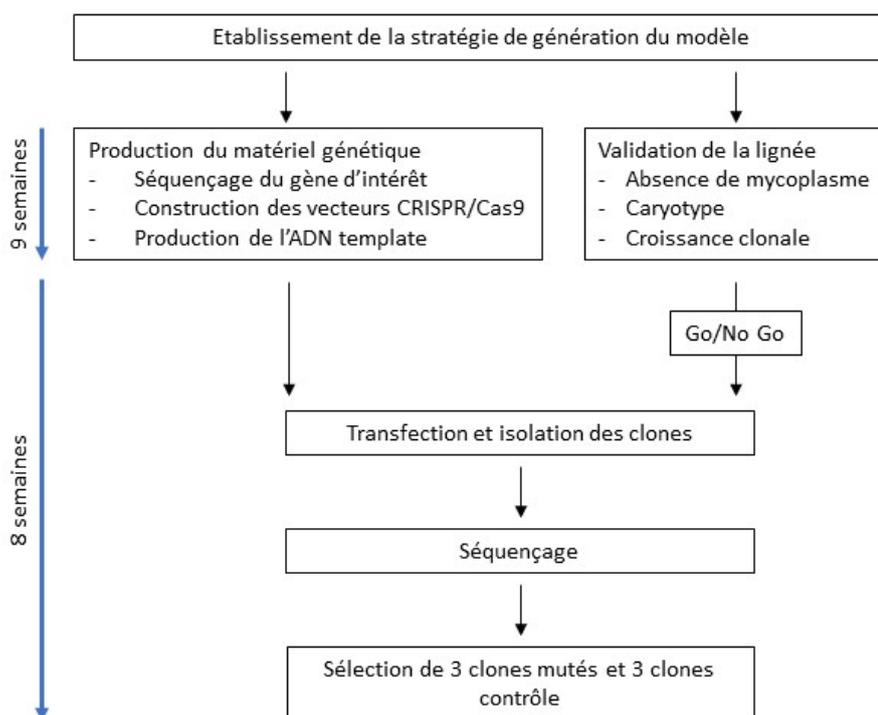


FIGURE 7.3 – Étapes de production d'un modèle cellulaire OI par édition génétique. Ces étapes ont été réalisées par la société genOway.

Gène	Mutation	Protéine	Nombre de cas	Phénotypes associés
<i>COL1A1</i>	C.3118G>A	p.Gly1040Ser	18	16 OI III + 2 OI II
	C.2299G>A	p.Gly767Ser	36	Majoritairement OI III
	C.2596G>T	p.Gly866Cys	5	4 OI III+ 1 OI II
	C.3226G>A	p.Gly1076Ser	14	OI III ou IV
	C.2362G>A	p.Gly788Ser	8	OI III ou IV
<i>COL1A2</i>	C.1378G>A	p.Gly460Ser	17	14 OI III + 3 OI IV
	C.2845G>A	p.Gly949Ser	9	OI II ou OI III
	C.1009G>T	p.Gly331Asp	5	majoitairement OI III
	C.2972G>T	p.Gly991Val	3	2 OI III + 1 OI IV

TABLE 7.1 – Mutations génétiques associées à l'OI portées par *COL1A1* ou *COL1A2* sélectionnées pour le développement de modèles cellulaires.

Cette première sélection de mutations cibles a été transmise à genOway pour évaluer leur compatibilité avec une stratégie d'édition génétique par CRISPR/Cas9 grâce à une analyse bio-informatique.

Cette analyse bio-informatique a pour objectif d'évaluer certains critères essentiels

pour prévoir le succès d'insertion de la mutation. Ainsi, afin d'introduire une mutation ponctuelle ciblée avec la méthode CRISPR/Cas9, il faut choisir la voie de réparation par recombinaison homologue. Pour cela, il faut introduire dans le noyau de la cellule un ADN modèle porteur de la mutation à introduire. Pour que l'introduction de la mutation fonctionne, certains critères doivent être respectés :

- le site de coupure par l'enzyme doit être à une distance inférieure ou égale à 5 paires de base du lieu de la mutation à insérer,
- l'efficacité de coupure prédite par l'outil CRISPOR [348] doit avoir un score supérieur à 70,
- le site de coupure doit être spécifique de la mutation à introduire : peu de sites hors de la zone cible doivent être prédits,
- le contenu en base G et C doit être compris entre 40 et 70 %.

La priorité a été donnée aux mutations portées par *COL1A1* car elles ont été décrites chez plus de patients que celles identifiées pour *COL1A2* (tableau 7.1). Les résultats sont présentés dans le tableau 7.2. Étant donné que nous souhaitons introduire la même mutation dans la lignée d'ostéoblastes et de fibroblastes, les analyses sont valables pour les deux types de cellules.

Mutation	Protéine	Conclusion des analyses
3118G>A	Gly1040Ser	Non recommandé car le contenu GC est trop élevé
2299G>A	Gly767Ser	Non recommandé car la distance avec le site de coupure est trop grande (18bp)
2596G>T	Gly866Cys	Non recommandé car l'efficacité de coupure prédite est faible
3226G>A	Gly1076Ser	Bon design
2362G>A	Gly788Ser	Non recommandé car la distance avec le site de coupure est trop grande (18bp)

TABLE 7.2 – Vérification du respect des critères essentiels pour l'introduction d'une mutation génétique ponctuelle.

Une seule mutation parmi les 5 sélectionnées pour *COL1A1* satisfait les critères de sélection. Cependant, des analyses supplémentaires ont montré que cette mutation risquait de perturber la maturation de l'ARN messenger. Elle n'a donc pas été retenue non plus. Cependant, une mutation portée par *COL1A2* (Gly460Ser) remplit également les critères pour l'introduction d'une mutation par CRISPR/Cas9.

Aucun site de coupure hors de la zone d'intérêt n'a été prédit par l'analyse bio-informatique pour cette mutation. Cependant, cela ne garantit pas totalement l'absence de coupure non désirée hors de la zone ciblée. Afin de pouvoir détecter la présence éventuelle d'une mutation autre que celle attendue, 3 clones porteurs de la mutation seront générés en parallèle. Ainsi, si un clone présente un comportement différent des autres, la présence d'une mutation hors de la zone cible sera présumée.

Si la mutation ponctuelle introduite ne modifie pas le site de coupure de l'enzyme, celle-ci peut couper à nouveau l'ADN et introduire une mutation supplémentaire. Pour éviter ce problème, une mutation silencieuse (c'est-à-dire qui ne provoque pas de mutation sur la protéine) sera introduite sur le site de coupure afin d'empêcher la reconnaissance de la séquence ADN par l'enzyme.

Le risque de perturbation de la maturation de l'ARN messager, que ce soit à cause de la mutation introduite ou de la mutation silencieuse, est négligeable pour la mutation Gly460Ser portée par *COL1A2*. C'est donc cette mutation qui a été retenue.

Plusieurs mutations portées par les gènes *COL1A1* ou *COL1A2* ont été identifiées dans la base de données [347]. Parmi ces mutations, 5 mutations sur *COL1A1* et 4 mutations sur *COL1A2* ont été retenues. Les analyses bio-informatiques effectuées par genOway ont montré que seule la mutation Gly460Ser (portée par *COL1A2*) satisfaisait les critères essentiels pour l'édition génétique par CRISPR/Cas9. C'est donc cette mutation qui a été sélectionnée pour générer des modèles cellulaires OI.

7.2.2 Édition génétique d'une cellule de la lignée ostéoblastique

7.2.2.1 Sélection de la lignée ostéoblastique

L'édition génétique par CRISPR/Cas9 requière de multiples étapes de prolifération, ce qui est une contrainte importante pour l'utilisation de cellules primaires qui dérivent rapidement en culture. Il est donc recommandé de travailler avec des cellules de lignée.

Une seule lignée d'ostéoblaste commerciale et non cancéreuse est disponible : la lignée hFOB 1.19 développée par Harris *et al* [75] et commercialisée par ATCC. Cette lignée a été immortalisée par la transfection d'un variant de l'antigène T de SV40 sensible à la température. Ainsi, à 34°C, les cellules prolifèrent. Lorsque la température est élevée à 39°C, la prolifération s'arrête et les cellules se différencient. Elles reproduisent un comportement "normal" d'ostéoblastes [349-352] et elles ont déjà été utilisées pour de l'édition génétique via CRISPR/Cas9 [353, 354].

Après transfection de la machinerie CRISPR/Cas9, les cellules seront isolées pour proliférer de façon clonale de manière à obtenir des populations homogènes. La capacité des cellules à proliférer en étant isolée les unes des autres est donc un prérequis à leur édition génétique. Lors de l'étape de validation de la lignée, genOway n'a pas réussi à faire proliférer les cellules de façon clonale : lorsque les cellules se retrouvaient isolées, elles ne se multipliaient plus. Cela signifie qu'après l'étape de mutation, il ne sera pas possible d'obtenir une population homogène de cellules. En effet, l'efficacité de l'induction d'une mutation génétique par CRISPR/Cas9 n'étant pas de 100 %, la population de cellules obtenue après mutation comportera des cellules mutées, des cellules non mutées et probablement des cellules avec des mutations non attendues. Les cellules non mutées

risquent de proliférer plus vite que les cellules mutées, donc la proportion de cellules mutées dans la population va progressivement diminuer. Pour contourner le problème, il est possible d'insérer des portions de gènes de protéine fluorescente ou de résistance à un antibiotique en même temps que la mutation d'intérêt. Cela permettrait d'opérer une sélection des cellules mutées (figure 7.4). Grâce à ces deux techniques, il est possible d'obtenir une population uniquement constituée de cellules mutées. Cependant, elles risquent de réduire la viabilité et/ou la capacité de différenciation des cellules, ainsi que de perturber l'expression du gène à cause la séquence génétique supplémentaire insérée. Les études qui ont utilisé ces cellules pour induire des mutations via CRISPR/Cas9 ont utilisé des méthodes de tri cellulaire par bioluminescence [353, 354] ou par sélection antibiotique [233]. Cependant, dans notre cas, la position de la mutation et de la séquence d'ADN supplémentaire nécessaire au tri cellulaire risque d'altérer l'expression du gène d'intérêt.

Il a donc été décidé de travailler avec une autre lignée cellulaire. La lignée de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse immortalisée par l'équipe du Pr Paul Genever à l'Université de York (lignée Y201) a été identifiée comme une alternative à la lignée hFOB 1.19 car elles ont la capacité de se différencier en ostéoblastes [236] et ont déjà été utilisées en bio-impression [355].

L'utilisation de la lignée a été validée par genOway. Cette lignée remplit les prérequis pour l'édition génétique par CRISPR/Cas9. Cependant, genOway a émis un avertissement à propos de l'augmentation du temps de doublement des cellules après leur électroporation.

7.2.2.2 Évaluation du comportement de la lignée Y201 dans les construits bio-imprimés

La pertinence de la lignée pour la production d'un modèle de tissu osseux *in vitro* a ensuite été évaluée. Le temps de doublement de cette lignée est d'environ 3 jours (contre 5 jours pour les ostéoblastes primaires humains) et la densité à confluence est de 40000 cellules/cm² (soit 2 fois plus que pour les ostéoblastes). La morphologie des cellules en 2D est présentée en figure 7.5. L'innocuité des solutions de polymérisation TG_HCa et TG_BCa a été validée en comparant les capacités de prolifération et production d'une matrice minéralisée des cellules, de la même manière que pour les ostéoblastes primaires (chapitre 4 section 4.3.1). Les résultats sont présentés en figure 7.5-C.

Le comportement des cellules Y201 dans les construits réticulés avec les conditions optimales (TG_BCa) et les moins adaptées (TG_HCa) a été évalué (figure 7.6 et tableau 7.3) pour comparer leur réponse à celle observée avec les ostéoblastes (chapitre 4). Nous avons observé les mêmes tendances de prolifération que pour les ostéoblastes, à savoir une prolifération supérieure dans la condition TG_BCa. Néanmoins, les Y201 ont une capacité de prolifération environ 16 fois plus importante que les ostéoblastes.

Après 13 jours de maturation, la morphologie des Y201 diffère entre les deux conditions : elles sont très étirées dans la condition TG_BCa alors qu'elles ont une morphologie similaire

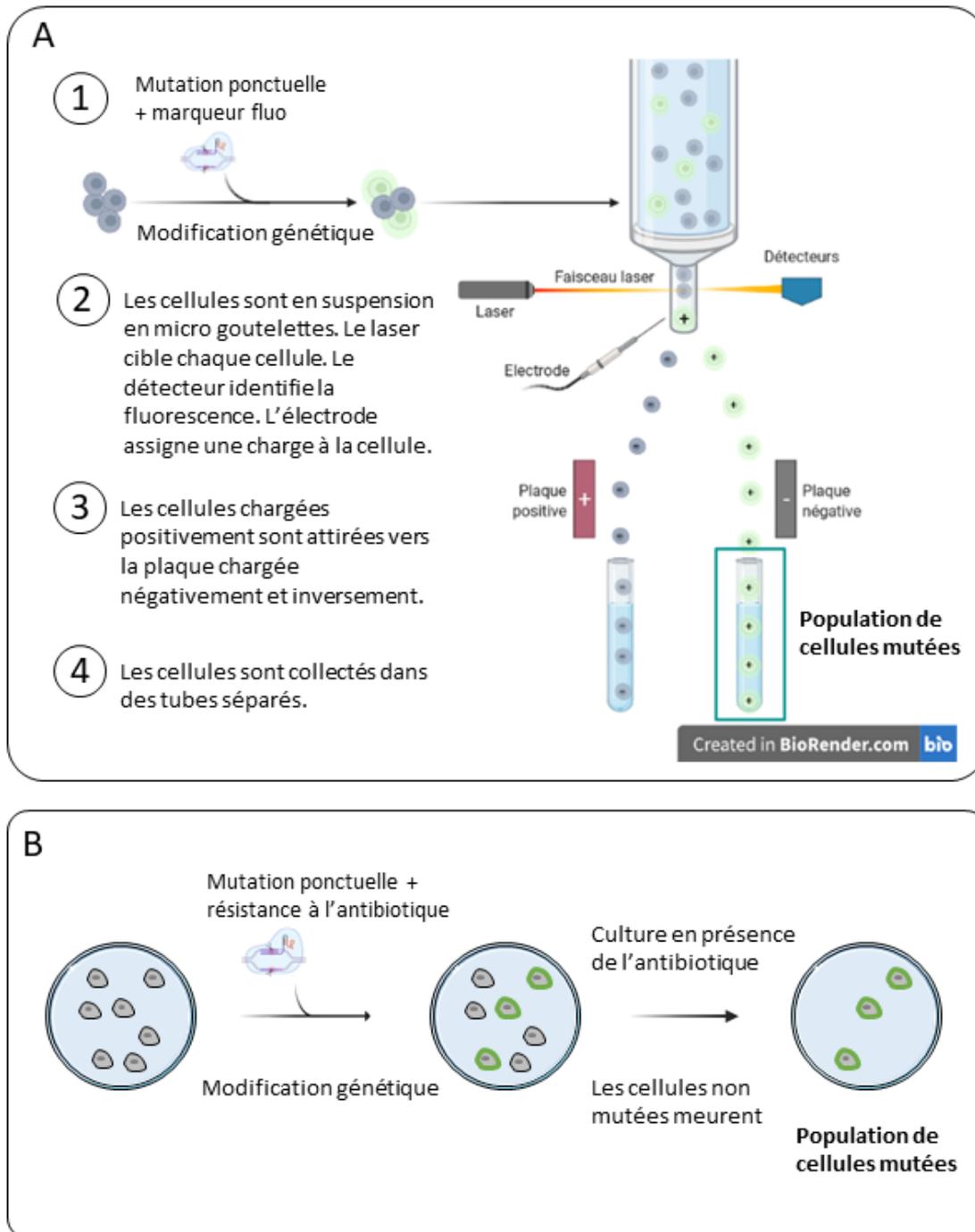


FIGURE 7.4 – Méthode de tri cellulaires des cellules mutées. A : Tri basé sur l'insertion d'un marqueur fluorescent lors de l'insertion de la mutation ponctuel. B : Tri basé sur l'insertion d'un gène de résistance à un antibiotique lors de l'insertion de la mutation ponctuel.

à celle observée en 2D dans la condition $TG_{H}Ca$. La formation d'une couche cellulaire dense en surface des construits rend difficile la comparaison des morphologies après 20 jours de culture.

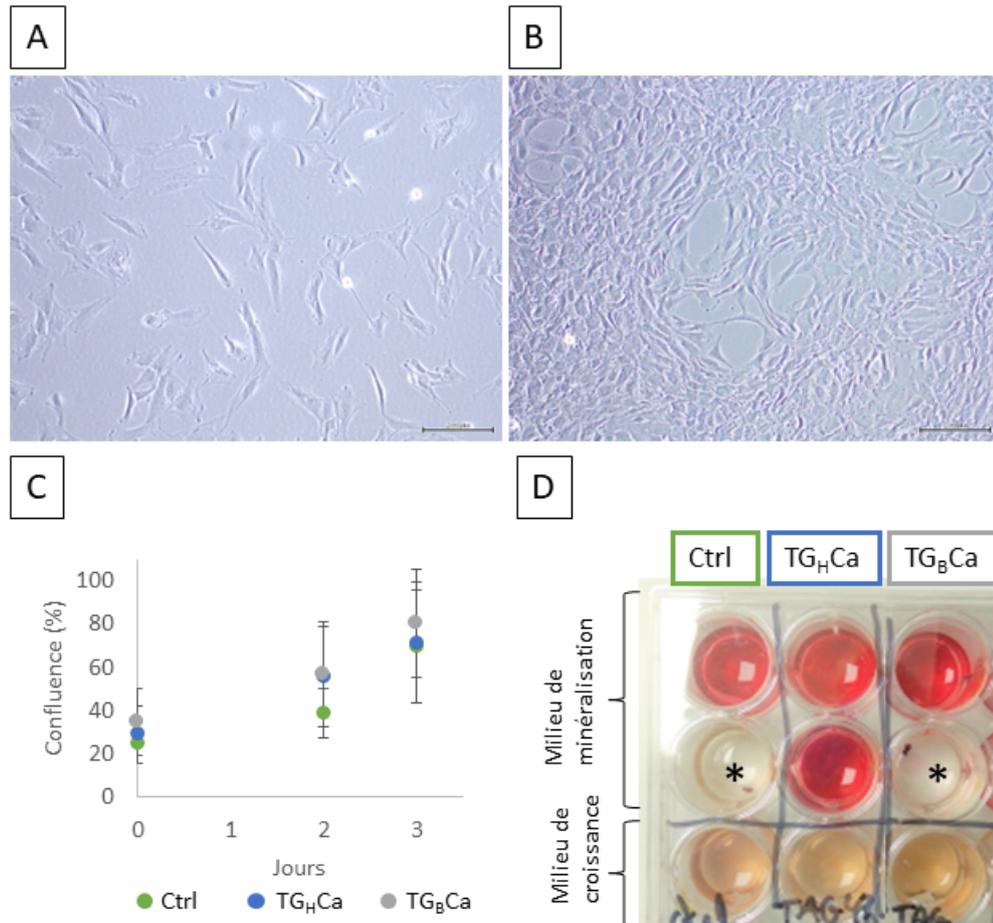


FIGURE 7.5 – Caractérisation des Y201 en 2D. A : Morphologie des cellules 24h après ensemencement. B : Morphologie des cellules à confluence. C : Impact des solutions de polymérisation sur la croissance cellulaire. D : Marquage de la minéralisation au rouge alizarine. Dans certains puits (*), les cellules se sont détachées lors de la différenciation.

Comme pour les ostéoblastes, la contraction des construits a eu lieu uniquement pour la condition TG_BCa entre le douzième et le vingtième jour puis se stabilise. Cependant, la contraction atteinte après 20 jours est 1,7 fois plus faible pour les Y201.

L'activité de l'ALP a également été mesurée. Elle était trop faible pour être détectée au deuxième jour de culture. Après 20 jours, l'activité était détectable du fait de l'augmentation du nombre de cellules. Néanmoins, elle restait 5 fois et 100 fois plus faible que pour les ostéoblastes dans les conditions TG_HCa et TG_BCa respectivement. Les différences entre les deux types cellulaires peuvent être expliquées par les différences de concentration en dexaméthasone : elle était 10 fois plus faible pour les Y201 que celle utilisée pour les expériences réalisées avec les ostéoblastes. Cette concentration avait été choisie pour reproduire le protocole de différenciation utilisée par James et al [236] mais il est probable qu'elle ne suffise pas à induire la différenciation dans les construits en 3D.

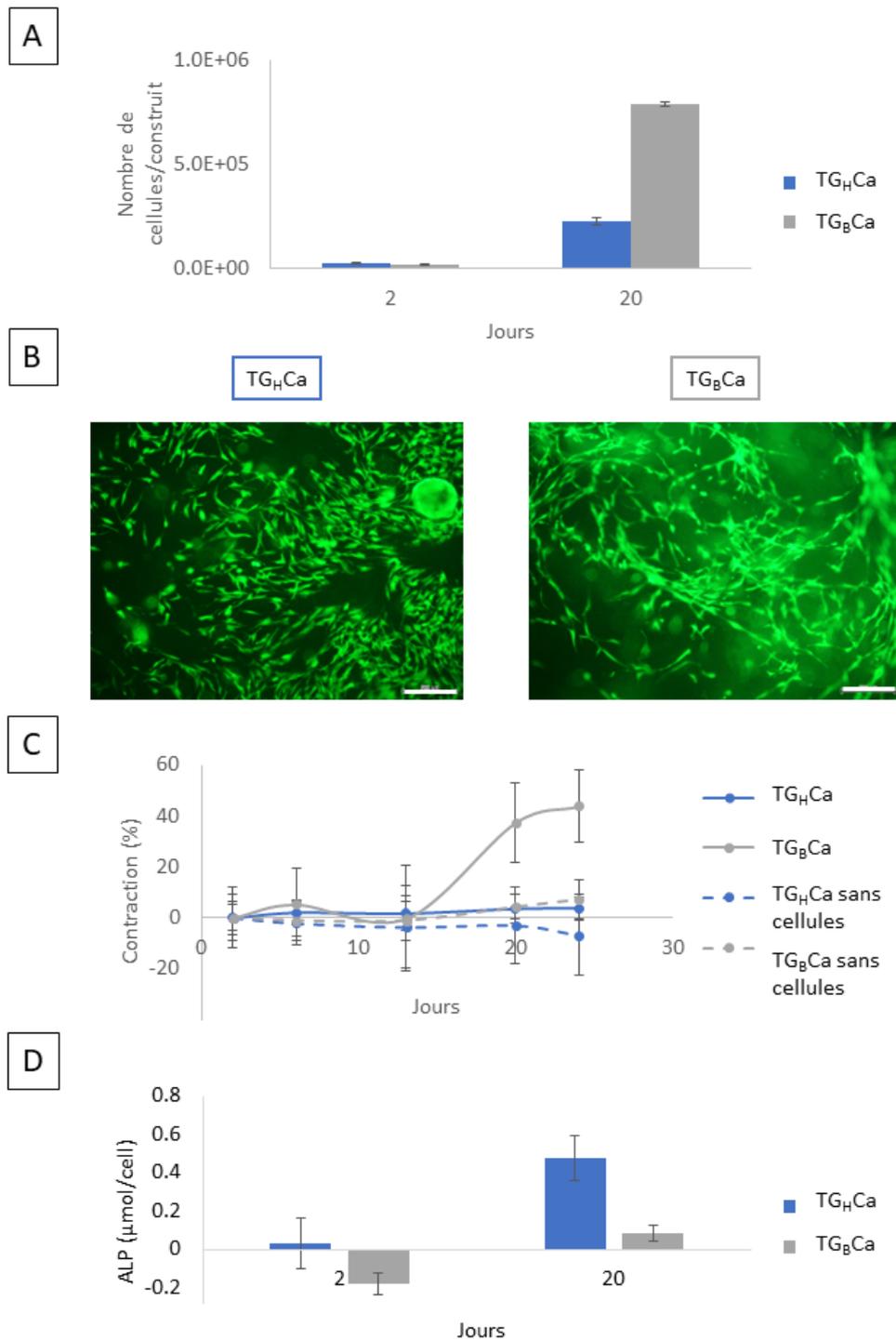


FIGURE 7.6 – Caractérisation du comportement des Y201 dans les construits bio-imprimés. A : Prolifération cellulaire. B : images prises au microscope après 13 jours de culture des cellules marquées en calcéine AM verte et observées avec un filtre à 475nm (objectif 10X). Barre d'échelle : 200 μm. C : Contraction des construits. D : Activité de l'ALP intracellulaire normalisée par le nombre de cellules.

Critères	Y201		HOB	
	TG _H Ca	TG _B Ca	TG _H Ca	TG _B Ca
Innocuité des solutions de réticulation en 2D	Validé	Validé	Validé	Validé
Facteur de prolifération sur 21 jours	8,2	40,6	0,5	1,6
Contraction après 20 jours (%)	3,4	37,4	4,7	63,5
Activité de l'ALP (μmol de p-NPP/cellule)	0,5	0,1	2,2	8,3

TABLE 7.3 – Comparaison du comportement des cellules de la lignée Y201 et des ostéoblastes primaires dans les construits bio-imprimés.

7.2.2.3 Production des cellules de la lignée ostéoblaste OI

Une fois l'utilisation de la lignée Y2501 validée et la stratégie de mutation établie, les cellules ont été transfectées. Cette étape a été réalisée trois fois et un total de 192 clones ont été évalués mais la mutation d'intérêt n'a pas été détectée. A ce jour, nous n'avons pas d'explication à l'absence d'insertion de la mutation d'intérêt.

Les travaux de la littérature qui ont produit des modèles OI par édition génétique ont utilisé des approches différentes. Deux lignées de cellules OI ont été produites à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). La première reproduit les mutations observées chez les patients atteints d'OI I en inactivant le gène *COL1A1* [231]. Ce type de mutation avait été écarté pour notre étude car les symptômes associés sont moins sévères [176], ce qui risquait de rendre la détection de différence de propriétés mécaniques *in vitro* plus difficile. La deuxième lignée a été établie en transformant des fibroblastes d'un patient OI II (forme létale en péri-natal) en iPSC [356]. La mutation était située dans la région du propeptide C de la chaîne de pro-collagène, ce qui empêche la formation de la triple hélice. Pour obtenir une lignée de cellules contrôles, la mutation a été corrigée simultanément à la transformation en iPSC. Cette étude a donc utilisé une approche inverse à la nôtre : la lignée de cellules contrôles a été établie en corrigeant la mutation portée par la cellule OI. Les deux études ont utilisé des iPSC pour effectuer les manipulations génétiques. Cette approche avait été écartée pour notre étude en raison de la complexité des protocoles de maintenance et de différenciation des iPSC en ostéoblastes.

Nous avons choisi de travailler avec deux lignées de cellules immortalisées par deux méthodes différentes. Ces deux lignées ont été choisies car leur comportement a déjà été caractérisé et elles ont été utilisées dans des modèles 3D [351, 355]. La lignée hFOB 1.19 a été choisie dans un premier temps pour l'édition génétique. Cependant, ces cellules n'étant pas capables de proliférer quand elles sont isolées, leur utilisation a été rejetée. La lignée de cellules souches mésenchymateuses Y201 a été identifiée comme une alternative. Ces cellules peuvent proliférer de manière clonale et répondent aux différentes conditions de polymérisation des construits de manière similaire aux ostéoblastes. Leur utilisation pour la production d'un modèle cellulaire OI a donc été validée. Cependant, l'édition génétique n'a pas fonctionné sur ces cellules : aucun des 192 clones isolés n'était porteur de la mutation. Pour établir un modèle OI, il faudrait donc privilégier une approche différente. L'immortalisation de cellules de patients atteints de pathologie, par transformation en iPSC [356] ou par immortalisation hTERT [357] a déjà été réalisée et pourrait représenter une alternative.

7.2.3 Édition génétique d'une cellule de lignée de fibroblaste

7.2.3.1 Sélection de la lignée de fibroblaste

Comme pour les ostéoblastes, il a été nécessaire d'identifier une lignée de fibroblastes immortalisées. La lignée BJ-5ta, immortalisée par induction de l'expression de la télomérase (hTERT) et commercialisée par ATCC, a été sélectionnée. Cette méthode permet d'immortaliser les cellules sans induire de phénotype cancéreux [358-360]. La lignée BJ-5ta provient de fibroblastes de prépuces et a été utilisée pour la production de modèles 3D de peau reconstruite [361-363].

Comme pour les ostéoblastes, l'utilisation de la lignée pour l'édition génétique a été validée par la société genOway. Les cellules de la lignée BJ-5ta sont capables de proliférer de manière clonale et supportent la transfection.

En parallèle, nous avons caractérisé le comportement de ces cellules en 2D et en 3D. Elles ont un temps de doublement d'environ 2 jours, contre 4 jours pour les fibroblastes primaires, et une densité à confluence de 37000 cellules/cm², contre 20000 cellules/cm² pour les fibroblastes. La morphologie des cellules est présentée en figure 7.7.

Nous avons montré dans le chapitre 5 que la réticulation des construits avec la condition TG_BCa procurait les résultats optimaux en termes de prolifération et de sécrétion de matrice. Seule cette condition a donc été évaluée. Aucun impact de l'incubation avec la solution de polymérisation sur la croissance n'a été constaté.

Les cellules ont été bio-imprimées à la même densité que les fibroblastes primaires (figure 7.8 et tableau 7.4). La capacité de prolifération des fibroblastes primaires était 3

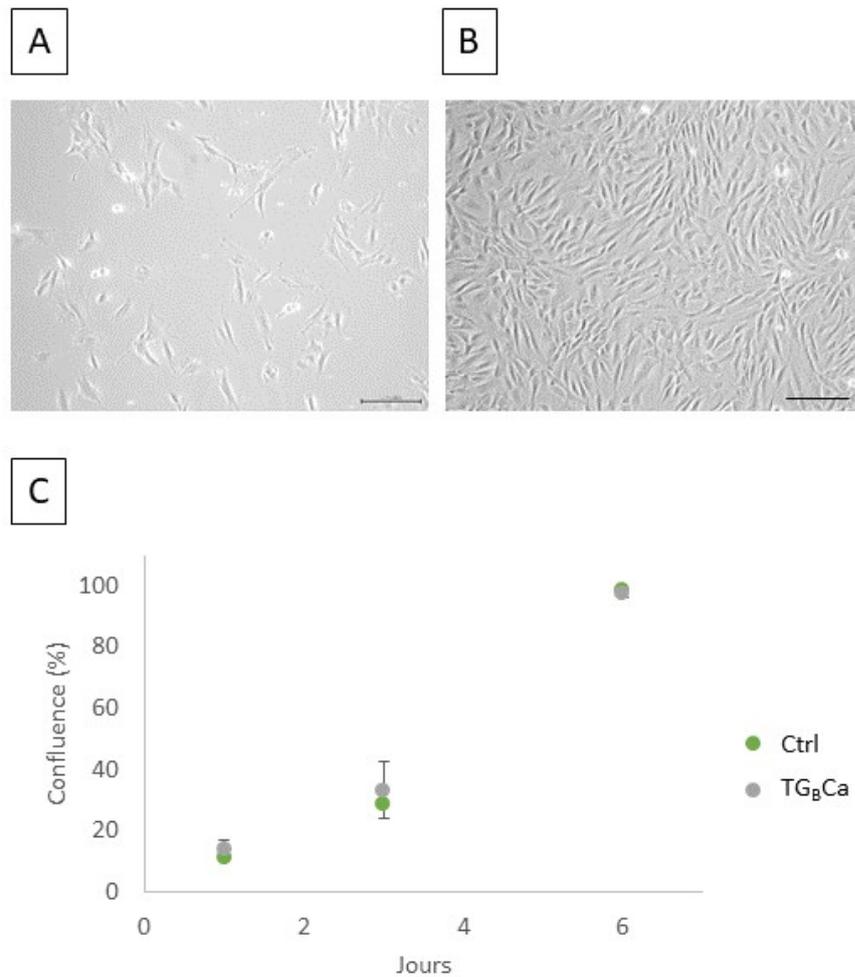


FIGURE 7.7 – Caractérisation du comportement des BJ-5ta en 2D. A : Morphologie des cellules 24h après ensemencement. B : Morphologie des cellules à confluence. Barre échelle : 200 μm . C : Comparaison de l'effet de l'incubation avec la solution de polymérisation (TG_BCa) sur la prolifération par rapport à l'incubation avec du milieu de culture (Ctrl).

fois plus élevée que celle des cellules de lignée BJ-5ta après 21 jours de culture. Cependant, la morphologie et la répartition des cellules étaient similaires avec une forme allongée et la formation d'un réseau dense de cellules connectées. En revanche, aucune contraction n'a été observée pendant les 21 jours de maturation pour les cellules BJ-5ta, alors que les fibroblastes primaires avaient provoqué une contraction de 24 % dans les mêmes conditions. Il a été démontré que le processus d'immortalisation, ainsi que le nombre de passages des cellules pouvaient avoir une influence sur leur capacité de contraction [364]. De plus, Liu *et al* [365] ont montré que les fibres contractiles d' α -SMA n'étaient pas exprimées dans les BJ-5ta. L'absence de fibres contractiles du cytosquelette pourraient expliquer l'absence de contraction des construits.

Malgré les différences de prolifération et de contraction observées dans les construits bio-imprimés entre les BJ-5ta et les fibroblastes primaires, ces cellules restent un modèle pertinent car elles ont prouvé leur capacité à sécréter du collagène I et de l'élastine [361,

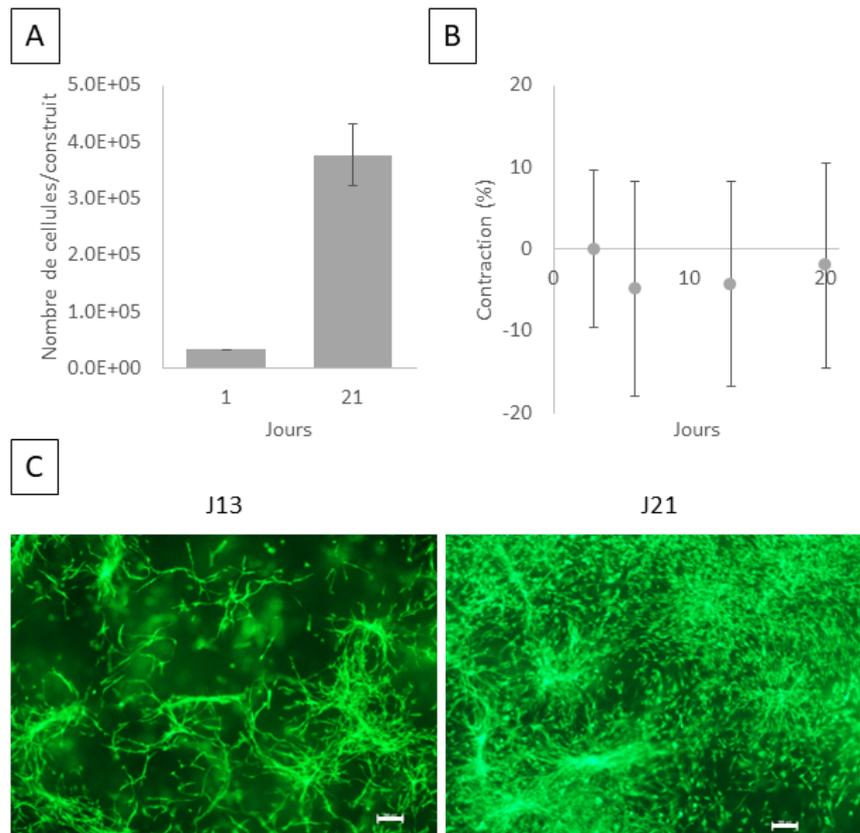


FIGURE 7.8 – Caractérisation du comportement des BJ-5ta dans les construits bio-imprimés. A : Prolifération. B : Contraction. C : images prises au microscope des cellules marquées en calcéine AM verte et observées avec un filtre à 475nm (objectif 4X). Barre échelle : 100 μm .

Critères	BJ-5ta	Fibroblastes primaires
Innocuité des solutions de réticulation en 2D	Validé	Validé
Facteur de prolifération sur 21 jours	11,5	37,1
Contraction après 20 jours (%)	-2,0	24,0

TABLE 7.4 – Comparaison du comportement des cellules de la lignée BJ-5ta et des fibroblastes primaires dans les construits bio-imprimés.

362]. Nous avons donc choisi de poursuivre la stratégie d'ingénierie cellulaire.

7.2.3.2 Production des cellules de la lignée fibroblaste OI

Après transfection des éléments nécessaires à l'édition génétique, les cellules ont été isolées pour obtenir des populations clonales. La région d'intérêt du gène *COL1A2* a été séquencée pour identifier la présence de mutations.

Un premier séquençage des populations clonales obtenues a révélé la présence de quatre ou cinq événements génétiques différents. Comme la diploïdie (présence de 2 copies

du gène d'intérêt) des cellules a été vérifiée au début du projet, le nombre maximum d'évènements génétiques attendus était de deux. L'hypothèse proposée pour expliquer la présence de plus de deux évènements génétiques était une mauvaise méthode d'isolement des clones cellulaires. En effet, il est envisageable qu'une population mixte comportant plusieurs clones différents ait été analysée.

Une nouvelle dilution limite a donc été réalisée pour obtenir des populations clonales homogènes. Le second séquençage a révélé des résultats identiques au premier. Cela signifie que les populations étaient bien homogènes. Les cellules des populations clonales ont donc dérivé et possèdent plus de deux copies du gène d'intérêt. Parmi les évènements génétiques identifiés, des gènes non mutés et des gènes porteurs de la mutation d'intérêt ont été observés lors du séquençage. Cependant, d'autres copies du gène portaient également des mutations non attendues.

Une analyse bio-informatique a été menée pour prédire l'impact de ces mutations sur la production de la protéine (tableau 7.5). Les deux clones obtenus portent chacun la mutation d'intérêt ainsi qu'un allèle contrôle, ce qui était la cible de notre étude.

Parmi les autres mutations recensées, certaines entraînent la production d'une protéine tronquée. Dans ce cas, il est peu probable que la protéine soit produite, donc cette mutation ne devrait pas impacter les résultats. A l'inverse, les deux clones possèdent également une mutation qui provoque l'insertion de plusieurs acides aminés dans la région de la triple hélice. Cela signifie que la protéine produite aura une structure modifiée. Or, l'ajout ou la suppression d'un ou deux motifs Gly-X-Y peut être à l'origine d'un décalage responsable d'OI létale [176]. La production de protéines modifiées risque donc d'avoir un impact majeur sur la synthèse et la structuration de la matrice extracellulaire. Comme plusieurs mutations sont présentes en même temps dans les clones, cela empêcherait de conclure quant à l'impact de la mutation. Les cellules produites fournissent donc un modèle de sécrétion perturbée du collagène I, mais ces clones ne portent pas une mutation observée chez un patient OI.

La présence de plus de deux copies du même gène indique que les cellules ont dérivé génétiquement. Plusieurs études ont montré que le caryotype des cellules immortalisées par hTERT était stable [357, 366]. La dérive observée de ces cellules est donc probablement induite par la manipulation génétique. Seul le gène d'intérêt a été séquençé, il n'est donc pas possible de savoir si la dérive observée touchait aussi d'autres gènes. L'impact de cette dérive sur le comportement global de la cellule ne peut donc pas être prévu.

Le protocole de transfection ayant été optimisé par la société genOway, il n'est pas possible de le modifier. Notre seule alternative possible consiste à utiliser une autre lignée de cellules immortalisées. D'autres fibroblastes de peau humaine sont disponibles auprès de la banque européenne de cellules (ECACC). Ces lignées n'ont pas été immortalisées par les mêmes méthodes. Il s'agit donc de nouvelles sources de cellules potentielles pour l'établissement d'une lignée de fibroblastes OI.

Clone	Allèle	Modification gé- nétique	Impact de la mutation	Prédiction sur la production de la pro- téine	Nature de la mutation
1	Gly460Ser	Mutation attendue	Stable	Mutation ponctuelle	
2	Aucune	Aucun	Stable	Contrôle	
6- C4	Délétion 1 paire de base	Décalage du cadre de lec- ture : codon stop prématuré	Protéine tronquée	Si la protéine n'est pas produite : KO. Si la protéine est produite : conséquence in- connue	
4	Insertion 13 paires de base	Décalage du cadre de lec- ture : codon stop prématuré	Protéine tronquée	Si la protéine n'est pas produite : KO. Si la protéine est produite : conséquence in- connue	
5	Insertion de 30 paires de base	Insertion de 10 acides ami- nés	Protéine avec 10 acides aminés supplé- mentaires dans la région de la triple hélice	Modification de la structure de la protéine : conséquence inconnue	
1	Gly460Ser	Mutation attendue	Stable	Mutation ponctuelle	
2	Aucune	Aucun	Stable	Contrôle	
6- E4	Insertion 1 paire de base	Décalage du cadre de lec- ture : codon stop prématuré	Protéine tronquée	Si la protéine n'est pas produite : KO. Si la protéine est produite : conséquence in- connue	
4	Insertion 18 paires de base	insertion de 6 acides aminés	Protéine avec 6 acides aminés supplé- mentaires dans la région de la triple hélice	Modification de la structure de la protéine : conséquence inconnue	

TABLE 7.5 – Résultats du séquençage des événements génétiques et impact prédit sur la protéine par les analyses bio-informatiques.

La lignée de fibroblastes immortalisée par hTERT, BJ-5ta, a été sélectionnée pour l'induction d'une mutation associée à l'OI dans une lignée de fibroblastes. Ces cellules ne sont pas impactées par la mise en contact avec la solution de réticulation et prolifèrent dans les construits bio-imprimés, bien qu'à un taux moins élevé que les fibroblastes primaires. Ces cellules ont montré leur capacité à synthétiser du collagène I et de l'élastine [361, 362]. Cependant, malgré leur capacité à proliférer de façon clonale, cette lignée n'a pas non plus permis de générer un modèle OI satisfaisant suite à l'apparition de copies surnuméraires du gène cible portant des mutations non attendues.

Conclusion

Deux approches en parallèle ont été initiées pour obtenir des cellules présentant des mutations associées à l'OI : d'une part des cellules primaires issues de patients, et d'autre part des cellules immortalisées modifiées par la méthode CRISPR/Cas9. Malheureusement, aucun patient correspondant aux critères d'inclusion n'a été recruté pendant la durée de l'étude. L'édition génétique sur les lignées de cellules choisies n'a pas non plus abouti à l'obtention de cellules reproduisant les mutations génétiques observées chez les patients. La rédaction d'un protocole d'obtention de déchets osseux chez des patients enfants, plus souvent opérés que les adultes, pourrait augmenter la probabilité d'obtenir des tissus de patients OI pour l'extraction de cellules. L'édition génétique pourrait également être renouvelée avec d'autres lignées immortalisées. Une approche inverse pourrait également être envisagée : des cellules de patients OI pourraient être immortalisées et la mutation corrigée par CRISPR/Cas9, comme cela a été réalisé pour des cellules d'un patient atteint d'OI létale [356].

Conclusion générale et perspectives

Ce travail s'inscrivait au coeur d'un projet consistant à établir un lien entre les effets de l'ostéogenèse imparfaite sur les tissus osseux et dermique. Pour cela, des modèles *in vitro* bio-imprimés de ces deux tissus ont été développés et caractérisés d'un point de vue de la biomécanique et de la physiologie cellulaire.

Le premier chapitre de bibliographie a présenté la structure et la composition des tissus d'intérêt, l'os et la peau. Les différents modèles *in vitro* existants ont été présentés. Nous nous sommes concentrés sur les hydrogels car cette technique offre aux cellules un environnement en trois dimensions avec lequel elles peuvent interagir. Les hydrogels peuvent être obtenus par moulage ou par bio-impression. La bio-impression permet une plus grande diversité de formes et de porosité que le moulage, c'est pourquoi cette méthode de bio-fabrication était notre cible. L'analyse de la littérature a montré, qu'à notre connaissance, aucun modèle *in vitro* bio-imprimé de tissu osseux ne montrait la différenciation complète d'ostéoblastes primaires en ostéocytes. Dans le cas de la peau, bien que des modèles bio-imprimés existent, les propriétés mécaniques des hydrogels utilisés sont rarement rapportées. Enfin, nous avons décrit les causes et les conséquences de l'ostéogenèse imparfaite, une maladie génétique rare qui affecte le collagène I. Cette pathologie a été étudiée grâce à différents modèles animaux et cellulaires *in vitro* cultivés en deux dimensions. La physiologie cellulaire étant fortement impactée par l'environnement cellulaire, et notamment les propriétés biomécaniques de la matrice extracellulaire et ses stimuli envers les cellules, il est stratégique et plus pertinent d'étudier cette question dans un contexte tri-dimensionnel. C'est pourquoi nous avons choisi de développer des modèles *in vitro* bio-imprimés de derme et de tissu osseux.

Le premier chapitre de résultats a décrit le développement d'hydrogels bio-imprimés aux propriétés mécaniques et structurales modulables. Pour cela, nous avons modifié la composition des solutions de réticulation utilisées pour consolider les hydrogels. Nous avons ainsi obtenu deux hydrogels avec un comportement élastique. Cependant, l'un avait un module d'élasticité élevé de 30 kPa et l'autre un module bas de 8 kPa. Un troisième hydrogel avec un module d'élasticité de 8 kPa a également été obtenu. Contrairement aux deux premiers qui conservaient leur comportement élastique tout au long de la culture, celui-ci adoptait un comportement viscoélastique après 33 jours de culture.

Les variations des solutions de réticulation ont aussi eu un impact sur la porosité

des hydrogels. La microscopie électronique à transmission nous a permis de mesurer la porosité à l'échelle nanométrique. La taille des pores observés étant largement inférieure à celle des cellules, celles-ci devront remodeler leur environnement pour pouvoir se déplacer dans l'hydrogel.

Dans le chapitre suivant, nous avons étudié l'influence de trois paramètres sur le développement de modèles de tissu osseux *in vitro* : la méthode de bio-fabrication, le choix du type cellulaire et les propriétés mécaniques et structurales des hydrogels. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'innocuité du procédé de bio-impression sur les ostéoblastes primaires humains. Nous avons ensuite comparé les comportements de différents types cellulaires utilisés dans la littérature pour le développement de modèles *in vitro* de tissu osseux. La lignée de cellules MC3T3, bien que couramment utilisée dans les modèles en trois dimensions, a montré des différences de comportement en termes de prolifération, différenciation et capacité de contraction des hydrogels. Ainsi, malgré leurs avantages tels que leur prolifération rapide et leur grande capacité de division avant d'entrer en sénescence, nous avons choisi de développer nos modèles *in vitro* à partir d'ostéoblastes primaires humains. Nous avons ensuite pu étudier l'influence des propriétés mécaniques et structurales des hydrogels sur le comportement des ostéoblastes. Tous les hydrogels étudiés ont permis l'expression du marqueur PHEX, caractéristique des ostéocytes, par les cellules après 35 jours de culture. Cependant, seule la condition avec le module d'élasticité bas (8 kPa) et un comportement viscoélastique satisfaisaient les critères de cinétique de prolifération cellulaire et d'activité de la phosphatase alcaline, ainsi que de sécrétion de matrice extracellulaire. C'est donc cette condition qui a été retenue pour la bio-fabrication d'un modèle de tissu osseux *in vitro*.

L'influence des propriétés mécaniques et structurales sur le comportement des fibroblastes a également été analysée. Les trois conditions évaluées ont montré les mêmes tendances de prolifération avec une phase de croissance puis une stabilisation. Cependant, la densité maximale de cellules a été obtenue pour la condition avec le module d'élasticité bas et un comportement viscoélastique. C'est également dans cette condition que le remodelage de l'hydrogel a été le plus important. En effet, la contraction de l'hydrogel et la sécrétion de matrice extracellulaire ont été plus élevées dans cette condition que dans les deux autres. Cependant, toutes les conditions ont montré l'expression des fibres contractiles d' α -SMA par les cellules. Cela signifie que toutes les cellules se sont différenciées en myofibroblastes, cellules impliquées dans le processus de cicatrisation de la peau.

La génération de ces modèles *in vitro* a nécessité d'adapter les méthodes de caractérisation biomécaniques existantes pour caractériser les interactions entre les cellules et leur environnement. Deux méthodes de caractérisation ont été employées : la micro-indentation pour mesurer les propriétés mécaniques des construits suite à la sécrétion de matrice et la quantification des forces de traction générées par les cellules et responsables de la contraction des construits.

La caractérisation mécanique des construits par micro-indentation a nécessité des

adaptations des méthodes utilisées traditionnellement dans la littérature. Dans un premier temps, les construits ont été considérés comme des matériaux élastiques. Le fit des courbes de force en fonction du déplacement par le modèle de Hertz a validé l'utilisation de cette hypothèse. La première amélioration de la méthode consiste à prendre en compte les effets du substrat. En effet, dans le cas de matériaux fins et mous comme les nôtres, le substrat rigide sur lequel sont posés les échantillons contribuent à la mesure de force enregistrée par l'indenteur. Nous avons donc utilisé deux modèles de correction de l'effet du substrat disponibles dans la littérature. Les modules d'élasticité de nos construits corrigés par ces deux modèles étaient équivalents. La comparaison des courbes expérimentales et numériques a montré que lorsque le module d'élasticité était inférieur à 2 kPa, la fonction de correction a permis de réduire l'écart entre les deux courbes.

Nous avons ensuite pris en compte la viscoélasticité des construits, visualisées par l'augmentation de l'hystérésis après 33 jours de culture. Pour cela, nous avons utilisé une méthode qui permet d'obtenir les paramètres viscoélastiques à partir des essais habituels d'indentation. En appliquant cette méthode sur nos données, nous avons pu extraire les modules d'élasticité instantané et à l'infini, ainsi que le temps de relaxation, qui sont habituellement obtenus à partir d'essais de relaxation. Nous avons donc pu exploiter les mêmes courbes d'indentation avec un modèle élastique ou viscoélastique. Cela signifie qu'un seul essai permet d'obtenir les propriétés élastiques et viscoélastiques d'un échantillon, sans nécessiter d'émettre une hypothèse préalable sur le comportement du matériau. Cela offre un gain de temps considérable et permet de s'affranchir des inconvénients de la relaxation, tels que la dérive des capteurs au cours du temps.

L'action des cellules sur leur environnement a également été évaluée par leur capacité à contracter les hydrogels au sein desquels elles étaient ensemencées. Le modèle biomécanique proposé pour calculer les forces de contraction générées par les cellules est non-destructif, nécessitent uniquement des images macroscopiques de l'hydrogel et permet le suivi longitudinal à long terme des capacités contractiles des cellules.

Enfin, nous avons mené deux approches en parallèle pour l'obtention d'ostéoblastes et de fibroblastes OI : d'une part, l'obtention de cellules primaires extraites des tissus de patient atteints d'OI, et d'autre part l'édition génétique de cellules saines pour reproduire une mutation associée à l'OI. Les cellules primaires reproduisent la variabilité phénotypique observée chez les patients alors qu'à l'inverse, l'édition génétique permet d'obtenir une lignée de cellules OI en tout point identique à la lignée contrôle, à l'exception de la mutation d'intérêt.

Un dossier a été rédigé pour présenter l'étude et obtenir l'autorisation de récupérer des déchets opératoires. Ce dossier a été accepté par un comité de protection des personnes (CPP), mais malheureusement aucun patient n'a été recruté sur la durée de la thèse. En effet, l'OI est une maladie rare dont les symptômes sont moins sévères chez les patients adultes. Pour augmenter nos chances de recruter des patients, il faudrait déposer un dossier pour l'obtention de déchets opératoires de patients enfants.

L'édition génétique par la technique CRISPR/Cas9 a été réalisée sur une lignée de cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse, précurseurs des ostéoblastes, et une lignée de fibroblastes. La mutation retenue correspondait à une mutation observée *in vivo* chez des patients atteints de formes sévères de l'OI (OI III). Malheureusement, les manipulations génétiques n'ont pas abouti aux résultats attendus : aucune cellule porteuse de la mutation cible n'a été produite.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse soulèvent plusieurs perspectives intéressantes. Premièrement, les résultats obtenus pour les modèles de tissu osseux sont surprenants car les meilleures différenciation des ostéoblastes en ostéocytes et sécrétion de matrice extracellulaire sont obtenues avec les construits possédant un module d'élasticité de 8 kPa. Cela est surprenant car le module d'élasticité de l'ostéoïde (la matrice extracellulaire non minéralisée) est de 27 kPa. Même si cette valeur est probablement surestimée, les modules d'élasticité de nos construits en sont très éloignés. Cependant, en modifiant les valeurs du module d'élasticité, nous avons également modifié le comportement viscoélastique de l'hydrogel, ainsi que sa porosité et sa sensibilité aux protéases matricielles. Il serait donc intéressant d'établir un plan d'expérience pour séparer l'effet des ces différents paramètres sur le comportement des ostéoblastes.

Le modèle de tissu osseux pourrait être amélioré en ajoutant des stimulations mécaniques pendant la maturation. Il a en effet été démontré que des stimulations en compression ou en cisaillement avaient des effets bénéfiques sur la différenciation et la sécrétion de matrice extracellulaire. Cela serait d'autant plus intéressant que notre modèle permet la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes, qui sont les cellules mécanosenseurs de la matrice extracellulaire osseuse.

Le modèle de derme pourrait également être amélioré en ensemençant des kératinocytes par-dessus pour former un épiderme. Il serait aussi intéressant de quantifier la sécrétion de collagène III, et notamment le ratio de synthèse de collagène I/collagène III. Il a en effet été montré que ce ratio pouvait différer entre les cellules OI et contrôles.

En conclusion, ces travaux ont montré pour la première fois la bio-impression d'ostéoblastes primaires capables de remodeler l'hydrogel et de se différencier en ostéocytes. Les construits qui possédaient le module d'élasticité le plus faible et un comportement viscoélastique ont fourni les meilleurs modèles *in vitro* de tissu osseux et de derme, en termes de physiologie cellulaire et de sécrétion de matrice extracellulaire. Ces modèles peuvent donc être utilisés pour l'étude de pathologie du collagène I, telle que l'ostéogenèse imparfaite.

Références

1. BOU-GHARIOS, G., ABRAHAM, D. & de CROMBRUGGHE, B. in *Principles of Bone Biology (Fourth Edition)* (éd. BILEZIKIAN, J. P., MARTIN, T. J., CLEMENS, T. L. & ROSEN, C. J.) 295-337 (Academic Press, 1^{er} jan. 2020).
2. SHOULDERS, M. D. & RAINES, R. T. COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. *Annual review of biochemistry* **78**, 929-958 (2009).
3. PATINO, M. G., NEIDERS, M. E., ANDREANA, S., NOBLE, B. & COHEN, R. E. Collagen : An Overview. *Implant Dentistry* **11**, 280-285 (sept. 2002).
4. PLAGER, D. A., BIEBER, T. & PITTELKOW, M. R. in *Middleton's Allergy (Eighth Edition)* (éd. ADKINSON, N. F. *et al.*) 518-539 (W.B. Saunders, London, 1^{er} jan. 2014).
5. BRODSKY, B. & PERSIKOV, A. V. in *Advances in Protein Chemistry* 301-339 (Academic Press, 1^{er} jan. 2005).
6. BAKER, B. M. & CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science* **125**, 3015-3024 (1^{er} juill. 2012).
7. CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **3**, S131-S139 (Suppl 3 nov. 2008).
8. RHO, J.-Y., KUHN-SPEARING, L. & ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* **20**, 92-102 (mars 1998).
9. SAFADI, F. F. *et al.* in *Bone Pathology* (éd. KHURANA, J. S.) 1-50 (Humana Press, Totowa, NJ, 2009).
10. JEE, W. in *Bone Mechanics Handbook, Second Edition* (éd. COWIN, S.) 1-1-1-68 (CRC Press, 15 mars 2001).
11. ROHRBACH, D. *et al.* Spatial distribution of tissue level properties in a human femoral cortical bone. *Journal of Biomechanics* **45**, 2264-2270 (31 août 2012).
12. MORGAN, E. F., UNNIKRISSAN, G. U. & HUSSEIN, A. I. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annual Review of Biomedical Engineering* **20**, 119-143 (4 juin 2018).

13. LANDIS, W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* **16**, 533-544 (1^{er} mai 1995).
14. CANELÓN, S. P. & WALLACE, J. M. Beta-Aminopropionitrile-Induced Reduction in Enzymatic Crosslinking Causes In Vitro Changes in Collagen Morphology and Molecular Composition. *PLOS ONE* **11**, e0166392 (9 nov. 2016).
15. EYDEN, B. & TZAPHLIDOU, M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues : role of electron microscopy. *Micron* **32**, 287-300 (1^{er} avr. 2001).
16. WESS, T. in *Advances in Protein Chemistry* 341-374 (Elsevier, 2005).
17. SIMS, N. A. & MARTIN, T. J. in *Principles of Bone Biology* 89-110 (Elsevier, 2020).
18. DALLAS, S. L. & BONEWALD, L. F. Dynamics of the Transition from Osteoblast to Osteocyte. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1192**, 437-443 (2011).
19. JILKA, R. L., WEINSTEIN, R. S., BELLIDO, T., PARFITT, A. M. & MANOLAGAS, S. C. Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis) : Modulation by Growth Factors and Cytokines. *Journal of Bone and Mineral Research* **13**, 793-802 (1998).
20. JILKA, R., WEINSTEIN, R., PARFITT, A. & MANOLAGAS, S. Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis : Challenges and rewards. *Journal of Bone and Mineral Research* **22**, 1492-1501 (2007).
21. PARFITT, A. M. Bone-forming cells in clinical conditions. *The Osteoblast and Osteocyte*, *Bone* **1**, 351-429 (1990).
22. SIMS, N. A. & MARTIN, T. J. in *Principles of Bone Biology* 219-243 (Elsevier, 2020).
23. LIAN, J. B. & STEIN, G. S. Development of the osteoblast phenotype : molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *The Iowa Orthopaedic Journal* **15**, 118-140 (1995).
24. KLEIN-NULEND, J. & BONEWALD, L. in *Principles of Bone Biology* 133-162 (Elsevier, 2020).
25. COWIN, S. C. The significance of bone microstructure in mechanotransduction. *Journal of Biomechanics. Interaction of Mechanics and Biology in Knee Joint Restoration and Regeneration* **40**, S105-S109 (1^{er} jan. 2007).
26. FRANZ-ODENDAAL, T. A., HALL, B. K. & WITTEN, P. E. Buried alive : How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics* **235**, 176-190 (2006).
27. KARSDAL, M., ANDERSEN, T., BONEWALD, L. & CHRISTIANSEN, C. Matrix Metalloproteinases (MMPs) Safeguard Osteoblasts from Apoptosis during Transdifferentiation into Osteocytes : MT1-MMP Maintains Osteocyte Viability. *DNA and Cell Biology* **23**, 155-165 (1^{er} mars 2004).

28. HOLMBECK, K. *et al.* The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *Journal of Cell Science* **118**, 147-156 (1^{er} jan. 2005).
29. KAMIOKA, H., SUGAWARA, Y., HONJO, T., YAMASHIRO, T. & TAKANO-YAMAMOTO, T. Terminal Differentiation of Osteoblasts to Osteocytes Is Accompanied by Dramatic Changes in the Distribution of Actin-Binding Proteins. *Journal of Bone and Mineral Research* **19**, 471-478 (2004).
30. PAIC, F. *et al.* Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone* **45**, 682-692 (1^{er} oct. 2009).
31. SCHULZE, E., WITT, M., KASPER, M., LÖWIK, C. W. G. M. & FUNK, R. H. W. Immunohistochemical investigations on the differentiation marker protein E11 in rat calvaria, calvaria cell culture and the osteoblastic cell line ROS 17/2.8. *Histochemistry and Cell Biology* **111**, 61-69 (1^{er} jan. 1999).
32. GOWEN, L. C. *et al.* Targeted Disruption of the Osteoblast/Osteocyte Factor 45 Gene (OF45) Results in Increased Bone Formation and Bone Mass *. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 1998-2007 (17 jan. 2003).
33. POOLE, K. E. S. *et al.* Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *The FASEB Journal* **19**, 1842-1844 (2005).
34. DOTY, S. B. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcified Tissue International* **33**, 509-512 (1^{er} déc. 1981).
35. KAMIOKA, H., HONJO, T. & TAKANO-YAMAMOTO, T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* **28**, 145-149 (1^{er} fév. 2001).
36. ROBLING, A. G. & BONEWALD, L. F. The Osteocyte : New Insights. *Annual Review of Physiology* **82**, 485-506 (10 fév. 2020).
37. KLEIN-NULEND, J., BAKKER, A. D., BACABAC, R. G., VATSA, A. & WEINBAUM, S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone. The Osteocyte* **54**, 182-190 (1^{er} juin 2013).
38. MATIC, I. *et al.* Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *STEM CELLS* **34**, 2930-2942 (2016).
39. TAKAHASHI, N., KOBAYASHI, Y. & UDAGAWA, N. in *Principles of Bone Biology (Fourth Edition)* (éd. BILEZIKIAN, J. P., MARTIN, T. J., CLEMENS, T. L. & ROSEN, C. J.) 111-131 (Academic Press, 1^{er} jan. 2020).
40. TEZUKA, K. *et al.* Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 15006-15009 (mai 1994).
41. TEZUKA, K. *et al.* Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1106-1109 (14 jan. 1994).

42. NAKASHIMA, T. *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine* **17**, 1231-1234 (oct. 2011).
43. RODAN, G. A. & MARTIN, T. J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—A hypothesis. *Calcified Tissue International* **33**, 349-351 (déc. 1981).
44. HATTNER, R., EPKER, B. N. & FROST, H. M. Suggested Sequential Mode of Control of Changes in Cell Behaviour in Adult Bone Remodelling. *Nature* **206**, 489-490 (mai 1965).
45. PARFITT, A. M. Osteonal and hemi-osteonal remodeling : The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry* **55**, 273-286 (1994).
46. OWEN, R. & REILLY, G. C. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **6** (2018).
47. ERIKSEN, E. F., MELSEN, F. & MOSEKILDE, L. Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone : A kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals. *Metabolic Bone Disease and Related Research* **5**, 235-242 (1^{er} jan. 1984).
48. ERIKSEN, E. F., GUNDERSEN, H. J. G., MELSEN, F. & MOSEKILDE, L. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metabolic Bone Disease and Related Research* **5**, 243-252 (1^{er} jan. 1984).
49. NOGUEIRA, L. F. B. *et al.* Three-dimensional cell-laden collagen scaffolds : From biochemistry to bone bioengineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials* **n/a** (n/a 2021).
50. HASEGAWA, T. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochemistry and Cell Biology* **149** (1^{er} avr. 2018).
51. SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *European Cells and Materials* **15**, 53-76 (1^{er} avr. 2008).
52. WANG, W. & YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair : A review. *Bioactive Materials* **2**, 224-247 (1^{er} déc. 2017).
53. DESCHEPPER, M. *et al.* Des biomatériaux à l'ingénierie tissulaire : perspectives en réparation osseuse, 26 (2015).
54. ENGLER, A. J., SEN, S., SWEENEY, H. L. & DISCHER, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677-689 (25 août 2006).
55. MARTIN, R. B., BURR, D. B., SHARKEY, N. A. & FYHRIE, D. P. in *Skeletal Tissue Mechanics* (éd. MARTIN, R. B., BURR, D. B., SHARKEY, N. A. & FYHRIE, D. P.) 355-422 (Springer New York, New York, NY, 2015).
56. TAI, K., DAO, M., SURESH, S., PALAZOGLU, A. & ORTIZ, C. Nanoscale heterogeneity promotes energy dissipation in bone. *Nature Materials* **6**, 454-462 (juin 2007).

57. KINNER, B., GERSTENFELD, L. C., EINHORN, T. A. & SPECTOR, M. Expression of smooth muscle actin in connective tissue cells participating in fracture healing in a murine model. *Bone* **30**, 738-745 (1^{er} mai 2002).
58. PECK, W. A., STANLEY J. BIRGE, J. & FEDAK, S. A. Bone Cells : Biochemical and Biological Studies after Enzymatic Isolation. *Science* (11 déc. 1964).
59. GALLAGHER, J. A. in HELFRICH, M. H. & RALSTON, S. H. *Bone Research Protocols* 3-18 (Humana Press, New Jersey, 17 avr. 2003).
60. BAKKER, A. D. & KLEIN-NULEND, J. in *Bone Research Protocols* (éd. HELFRICH, M. H. & RALSTON, S. H.) 19-29 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012).
61. DI-SILVIO, L. & GURAV, N. in *Human Cell Culture : Primary Mesenchymal Cells* (éd. KOLLER, M. R., PALSSON, B. O. & MASTERS, J. R.) 221-241 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2001).
62. CZEKANSKA, E., RICHARDS, R. & HAYES, J. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells and Materials* **24**, 1-17 (9 juill. 2012).
63. VOEGELE, T. J. *et al.* The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth. *Anticancer research* **20**, 3575-3581 (1^{er} sept. 2000).
64. JONSSON, K. B., FROST, A., NILSSON, O., LJUNGHALL, S. & LJUNGGREN, Ö. Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells : A comparison. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **70**, 365-373 (1^{er} jan. 1999).
65. DILLON, J. P. *et al.* in *Bone Research Protocols* (éd. HELFRICH, M. H. & RALSTON, S. H.) 3-18 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012).
66. PEARCE, A., RICHARDS, R., MILZ, S., SCHNEIDER, E. & PEARCE, S. Animal models for implant biomaterial research in bone : A review. *European Cells and Materials* **13**, 1-10 (2 mars 2007).
67. GARDNER, O. F. W., ALINI, M. & STODDART, M. J. in *Cartilage Tissue Engineering* (éd. DORAN, P. M.) 41-52 (Springer New York, New York, NY, 2015).
68. WEHRLE, M. *et al.* Examination of Hydrogels and Mesenchymal Stem Cell Sources for Bioprinting of Artificial Osteogenic Tissues. *Cellular and Molecular Bioengineering* **12**, 583-597 (déc. 2019).
69. ANKERSEN, L. *et al.* Aging of human trabecular osteoblasts in culture. *Archives of Gerontology and Geriatrics. Free papers at the Vth International Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (IABG)* **19**, 5-12 (1^{er} jan. 1994).
70. SALDAÑA, L., BENSAMAR, F., BORÉ, A. & VILABOA, N. In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomaterialia* **7**, 4210-4221 (1^{er} déc. 2011).
71. KODAMA, H.-a., AMAGAI, Y., SUDO, H., KASAI, S. & YAMAMOTO, S. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Japanese Journal of Oral Biology* **23**, 899-901 (1981).

72. HEREMANS, H., BILLIAU, A., CASSIMAN, J. J., MULIER, J. C. & SOMER, P. d. In Vitro Cultivation of Human Tumor Tissues II. Morphological and Virological Characterization of Three Cell Lines. *Oncology* **35**, 246-252 (1978).
73. BILLIAU, A. *et al.* Human Interferon : Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (juill. 1977).
74. FOGH, J. & TREMPE, G. in *Human Tumor Cells in Vitro* (éd. FOGH, J.) 115-159 (Springer US, Boston, MA, 1975).
75. HARRIS, S. A., ENGER, R. J., RIGGS, L. B. & SPELSBERG, T. C. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *Journal of Bone and Mineral Research* **10**, 178-186 (1995).
76. PARTRIDGE, N. C., ALCORN, D., MICHELANGELI, V. P., RYAN, G. & MARTIN, T. J. Morphological and Biochemical Characterization of Four Clonal Osteogenic Sarcoma Cell Lines of Rat Origin. **43**, 8 (1983).
77. MAJESKA, R. J., RODAN, S. B. & RODAN, G. A. Parathyroid Hormone-Responsive Clonal Cell Lines from Rat Osteosarcoma*. *Endocrinology* **107**, 1494-1503 (1^{er} nov. 1980).
78. DIVIETI PAJEVIC, P. New and Old Osteocytic Cell Lines and 3D Models. *Current Osteoporosis Reports* **18**, 551-558 (1^{er} oct. 2020).
79. SEMEINS, C. M., BAKKER, A. D. & KLEIN-NULEND, J. in *Bone Research Protocols* (éd. HELFRICH, M. H. & RALSTON, S. H.) 43-53 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012).
80. Van der PLAS, A. & NIJWEIDE, P. Isolation and purification of osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* **7**, 389-396 (1992).
81. GU, G., NARS, M., HENTUNEN, T. A., METSIKKÖ, K. & VÄÄNÄNEN, H. K. Isolated primary osteocytes express functional gap junctions in vitro. *Cell and Tissue Research* **323**, 263-271 (1^{er} fév. 2006).
82. STERN, A. R. *et al.* Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. *BioTechniques* **52**, 361-373 (1^{er} juin 2012).
83. STERN, A. R. & BONEWALD, L. F. in *Osteoporosis and Osteoarthritis* (éd. WESTENDORF, J. J. & van WIJNEN, A. J.) 3-10 (Springer, New York, NY, 2015).
84. AYTURK, U. M. *et al.* An RNA-seq protocol to identify mRNA expression changes in mouse diaphyseal bone : Applications in mice with bone property altering Lrp5 mutations. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 2081-2093 (2013).
85. PRIDEAUX, M., FINDLAY, D. M. & ATKINS, G. J. Osteocytes : The master cells in bone remodelling. *Current Opinion in Pharmacology. Musculoskeletal* **28**, 24-30 (1^{er} juin 2016).
86. BERNHARDT, A., WOLF, S., WEISER, E., VATER, C. & GELINSKY, M. An improved method to isolate primary human osteocytes from bone. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik* **65**, 107-111 (1^{er} fév. 2020).

87. BERNHARDT, A., WEISER, E., WOLF, S., VATER, C. & GELINSKY, M. Primary Human Osteocyte Networks in Pure and Modified Collagen Gels. *Tissue Engineering Part A* **25**, 1347-1355 (16 jan. 2019).
88. ATKINS, G. J. *et al.* The induction of a catabolic phenotype in human primary osteoblasts and osteocytes by polyethylene particles. *Biomaterials* **30**, 3672-3681 (1^{er} août 2009).
89. KATO, Y., WINDLE, J. J., KOOP, B. A., MUNDY, G. R. & BONEWALD, L. F. Establishment of an Osteocyte-like Cell Line, MLO-Y4. *Journal of Bone and Mineral Research* **12**, 2014-2023 (1997).
90. KATO, Y. *et al.* Establishment of an Osteoid Preosteocyte-like Cell MLO-A5 That Spontaneously Mineralizes in Culture. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, 1622-1633 (2001).
91. WOO, S. M., ROSSER, J., DUSEVICH, V., KALAJZIC, I. & BONEWALD, L. F. Cell line IDG-SW3 replicates osteoblast-to-late-osteocyte differentiation in vitro and accelerates bone formation in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**, 2634-2646 (2011).
92. SPATZ, J. M. *et al.* The Wnt Inhibitor Sclerostin Is Up-regulated by Mechanical Unloading in Osteocytes in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 16744-16758 (3 juill. 2015).
93. WANG, K. *et al.* A Novel Osteogenic Cell Line That Differentiates Into GFP-Tagged Osteocytes and Forms Mineral With a Bone-Like Lacunocanalicular Structure. *Journal of Bone and Mineral Research* **34**, 979-995 (2019).
94. BODINE, P. V. N., TRAILSMITH, M. & KOMM, B. S. Development and characterization of a conditionally transformed adult human osteoblastic cell line. *Journal of Bone and Mineral Research* **11**, 806-819 (1996).
95. De WILDT, B. W. M. *et al.* From bone regeneration to three-dimensional in vitro models : tissue engineering of organized bone extracellular matrix. *Current Opinion in Biomedical Engineering. Biomaterials • Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **10**, 107-115 (1^{er} juin 2019).
96. ZHANG, C., BAKKER, A. D., KLEIN-NULEND, J. & BRAVENBOER, N. Studies on Osteocytes in Their 3D Native Matrix Versus 2D In Vitro Models. *Current Osteoporosis Reports* **17**, 207-216 (1^{er} août 2019).
97. HONMA, M. *et al.* RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 1936-1949 (2013).
98. BOUET, G., MARCHAT, D., CRUEL, M., MALAVAL, L. & VICO, L. In Vitro Three-Dimensional Bone Tissue Models : From Cells to Controlled and Dynamic Environment. *Tissue Engineering Part B : Reviews* **21**, 133-156 (2015).

99. LEMARIÉ, L., ANANDAN, A., PETIOT, E., MARQUETTE, C. & COURTIAL, E.-J. Rheology, simulation and data analysis toward bioprinting cell viability awareness. *Bioprinting* **21**, e00119 (1^{er} mars 2021).
100. MOUSER, V. H. M. *et al.* Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. *Biofabrication* **8**, 035003 (juill. 2016).
101. GUNGOR-OZKERIM, P. S., INCI, I., ZHANG, Y. S., KHADEMHOSEINI, A. & DOKMECI, M. R. Bioinks for 3D bioprinting : an overview. *Biomaterials science* **6**, 915-946 (1^{er} mai 2018).
102. CHAUDHURI, O. Viscoelastic hydrogels for 3D cell culture. *Biomaterials Science* **5**, 1480-1490 (26 juill. 2017).
103. NAITO, H. *et al.* The Effect of Mesenchymal Stem Cell Osteoblastic Differentiation on the Mechanical Properties of Engineered Bone-Like Tissue. *Tissue Engineering Part A* **17**, 2321-2329 (7 mai 2011).
104. SKOTTKE, J., GELINSKY, M. & BERNHARDT, A. In Vitro Co-Culture Model of Primary Human Osteoblasts and Osteocytes in Collagen Gels. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1998 (jan. 2019).
105. DUARTE CAMPOS, D. F. *et al.* Bioprinting Organotypic Hydrogels with Improved Mesenchymal Stem Cell Remodeling and Mineralization Properties for Bone Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials* **5**, 1336-1345 (2016).
106. NASELLO, G. *et al.* Primary Human Osteoblasts Cultured in a 3D Microenvironment Create a Unique Representative Model of Their Differentiation Into Osteocytes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8** (2020).
107. PEDRAZA, C. E., MARELLI, B., CHICATUN, F., MCKEE, M. D. & NAZHAT, S. N. An In Vitro Assessment of a Cell-Containing Collagenous Extracellular Matrix-like Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A* **16**, 781-793 (24 sept. 2009).
108. YANG, Y. *et al.* Bioprinting of an osteocyte network for biomimetic mineralization. *Biofabrication* **12**, 045013 (juill. 2020).
109. THRIVIKRAMAN, G. *et al.* Rapid fabrication of vascularized and innervated cell-laden bone models with biomimetic intrafibrillar collagen mineralization. *Nature Communications* **10**, 3520 (6 août 2019).
110. FEDOROVICH, N. E., DE WIJN, J. R., VERBOUT, A. J., ALBLAS, J. & DHERT, W. J. Three-Dimensional Fiber Deposition of Cell-Laden, Viable, Patterned Constructs for Bone Tissue Printing. *Tissue Engineering Part A* **14**, 127-133 (1^{er} jan. 2008).
111. BENDTSEN, S. T., QUINNELL, S. P. & WEI, M. Development of a novel alginate-polyvinyl alcohol-hydroxyapatite hydrogel for 3D bioprinting bone tissue engineered scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **105**, 1457-1468 (2017).

112. WÜST, S., GODLA, M. E., MÜLLER, R. & HOFMANN, S. Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting. *Acta Biomaterialia* **10**, 630-640 (1^{er} fév. 2014).
113. WENZ, A., BORCHERS, K., TOVAR, G. E. M. & KLUGER, P. J. Bone matrix production in hydroxyapatite-modified hydrogels suitable for bone bioprinting. *Biofabrication* **9**, 044103 (nov. 2017).
114. ZUO, Y. *et al.* Photo-Cross-Linkable Methacrylated Gelatin and Hydroxyapatite Hybrid Hydrogel for Modularly Engineering Biomimetic Osteon. *ACS Applied Materials & Interfaces* **7**, 10386-10394 (20 mai 2015).
115. SADAT-SHOJAI, M., KHORASANI, M.-T. & JAMSHIDI, A. 3-Dimensional cell-laden nano-hydroxyapatite/protein hydrogels for bone regeneration applications. *Materials Science and Engineering : C* **49**, 835-843 (1^{er} avr. 2015).
116. WANG, X.-F. *et al.* Nano hydroxyapatite particles promote osteogenesis in a three-dimensional bio-printing construct consisting of alginate/gelatin/hASCs. *RSC Advances* **6**, 6832-6842 (2016).
117. ZHANG, J. *et al.* Optimization of mechanical stiffness and cell density of 3D bioprinted cell-laden scaffolds improves extracellular matrix mineralization and cellular organization for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **114**, 307-322 (15 sept. 2020).
118. GAO, G. *et al.* Bioactive nanoparticles stimulate bone tissue formation in bioprinted three-dimensional scaffold and human mesenchymal stem cells. *Biotechnology Journal* **9**, 1304-1311 (2014).
119. WILMOTH, R. L., FERGUSON, V. L. & BRYANT, S. J. A 3D, Dynamically Loaded Hydrogel Model of the Osteochondral Unit to Study Osteocyte Mechanobiology. *Advanced Healthcare Materials* **9**, 2001226 (2020).
120. AZIZ, A. H., WILMOTH, R. L., FERGUSON, V. L. & BRYANT, S. J. IDG-SW3 Osteocyte Differentiation and Bone Extracellular Matrix Deposition Are Enhanced in a 3D Matrix Metalloproteinase-Sensitive Hydrogel. *ACS Applied Bio Materials* **3**, 1666-1680 (16 mars 2020).
121. HOSPODIUK, M., DEY, M., SOSNOSKI, D. & OZBOLAT, I. T. The bioink : A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances* **35**, 217-239 (1^{er} mars 2017).
122. NAQVI, S. M., PANADERO PÉREZ, J. A., KUMAR, V., VERBRUGGEN, A. S. K. & MCNAMARA, L. M. A Novel 3D Osteoblast and Osteocyte Model Revealing Changes in Mineralization and Pro-osteoclastogenic Paracrine Signaling During Estrogen Deficiency. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8** (2020).

123. KIM, W. & KIM, G. Collagen/bioceramic-based composite bioink to fabricate a porous 3D hASCs-laden structure for bone tissue regeneration. *Biofabrication* **12**, 015007 (2020).
124. DUARTE CAMPOS, D. *et al.* The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages. *Tissue Engineering - Part A* **21**, 740-756 (2015).
125. AMLER, A.-K. *et al.* 3D bioprinting of tissue-specific osteoblasts and endothelial cells to model the human jawbone. *Scientific Reports* **11**, 4876 (1^{er} mars 2021).
126. BERNHARDT, A., SKOTTKE, J., von WITZLEBEN, M. & GELINSKY, M. Triple culture of primary human osteoblasts, osteoclasts and osteocytes as an in vitro bone model. *International Journal of Molecular Sciences* **22** (2021).
127. CHOUDHURY, S. & DAS, A. Advances in generation of three-dimensional skin equivalents : pre-clinical studies to clinical therapies. *Cytotherapy* **23**, 1-9 (1^{er} jan. 2021).
128. BOUWSTRA, J. A., HELDER, R. W. J. & EL GHALBZOURI, A. Human skin equivalents : Impaired barrier function in relation to the lipid and protein properties of the stratum corneum. *Advanced Drug Delivery Reviews* **175**, 113802 (1^{er} août 2021).
129. MACKENZIE, I. C. Ordered Structure of The Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **65**, 45-51 (1^{er} juill. 1975).
130. BREITKREUTZ, D., KOXHOLT, I., THIEMANN, K. & NISCHT, R. Skin Basement Membrane : The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *BioMed Research International* **2013**, e179784 (21 mars 2013).
131. PROST-SQUARCIONI, C., FRAITAG, S., HELLER, M. & BOEHM, N. Histologie fonctionnelle du derme. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie. Derme et vieillissement : techniques de comblement* **135**, 5-20 (1^{er} jan. 2008).
132. WITTE, M. B. & BARBUL, A. GENERAL PRINCIPLES OF WOUND HEALING. *Surgical Clinics of North America* **77**, 509-528 (1^{er} juin 1997).
133. LANGTON, A. K., SHERRATT, M. J., GRIFFITHS, C. E. M. & WATSON, R. E. B. A new wrinkle on old skin : the role of elastic fibres in skin ageing. *International Journal of Cosmetic Science* **32**, 330-339 (2010).
134. BROUGHTON, G. I., JANIS, J. E. & ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* **117**, 12S (juin 2006).
135. JORGENSEN, A. M. *et al.* Bioprinted Skin Recapitulates Normal Collagen Remodeling in Full-Thickness Wounds. *Tissue Engineering Part A* **26**, 512-526 (mai 2020).

136. DARBY, I. A., LAVERDET, B., BONTÉ, F. & DESMOULIÈRE, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* **7**, 301-311 (6 nov. 2014).
137. KALRA, A. & LOWE, A. Mechanical Behaviour of Skin : A Review. *Journal of Material Science & Engineering* **5** (2016).
138. GALLAGHER, A. J., NÍ ANNAIDH, A., BRUYÈRE, K. & AL, E. *Dynamic Tensile Properties of Human Skin* in. IRCOBI Conference 2012, 12 - 14 September 2012, Dublin (Ireland) (International Research Council on the Biomechanics of Injury, 2012).
139. OTTENIO, M., TRAN, D., NÍ ANNAIDH, A., GILCHRIST, M. D. & BRUYÈRE, K. Strain rate and anisotropy effects on the tensile failure characteristics of human skin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **41**, 241-250 (1^{er} jan. 2015).
140. MANSCHOT, J. F. M. & BRAKKEE, A. J. M. The measurement and modelling of the mechanical properties of human skin in vivo—I. The measurement. *Journal of Biomechanics* **19**, 511-515 (1^{er} jan. 1986).
141. PAILLER-MATTEI, C., BEC, S. & ZAHOUANI, H. In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. *Medical Engineering & Physics* **30**, 599-606 (1^{er} juin 2008).
142. ZHENG, Y. & MAK, A. Effective elastic properties for lower limb soft tissues from manual indentation experiment. *IEEE Transactions on Rehabilitation Engineering* **7**, 257-267 (sept. 1999).
143. BOYER, G., ZAHOUANI, H., LE BOT, A. & LAQUIÈZE, L. In vivo characterization of viscoelastic properties of human skin using dynamic micro-indentation. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference* **2007**, 4584-4587 (2007).
144. BOYER, G., LAQUIÈZE, L., LE BOT, A., LAQUIÈZE, S. & ZAHOUANI, H. Dynamic indentation on human skin in vivo : ageing effects. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* **15**, 55-67 (fév. 2009).
145. BAREL, A., COURAGE, W. & CLARYS, P. in *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin, Second Edition, serup J., Jemec J., Grove G. (eds.), CRC Press, Taylor & Francis Group* (éd. SERUP, J., JEMEC, G. & GROVE, G.) 583-591 (Informa Healthcare, 2007).
146. HENDRIKS, F. M. *et al.* A numerical-experimental method to characterize the non-linear mechanical behaviour of human skin. *Skin Research and Technology* **9**, 274-283 (2003).

147. XING LIANG & BOPPART, S. Biomechanical Properties of *In Vivo* Human Skin From Dynamic Optical Coherence Elastography. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **57**, 953-959 (avr. 2010).
148. SANDERS, R. Torsional elasticity of human skin in vivo. *Pflügers Archiv* **342**, 255-260 (1^{er} sept. 1973).
149. AGACHE, P. G., MONNEUR, C., LEVEQUE, J. L. & DE RIGAL, J. Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. *Archives of Dermatological Research* **269**, 221-232 (1^{er} déc. 1980).
150. ACHTERBERG, V. F. *et al.* The Nano-Scale Mechanical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Dermal Fibroblast Function. *Journal of Investigative Dermatology* **134**, 1862-1872 (1^{er} juill. 2014).
151. GRANT, C. A., TWIGG, P. C. & TOBIN, D. J. Static and dynamic nanomechanical properties of human skin tissue using atomic force microscopy : Effect of scarring in the upper dermis. *Acta Biomaterialia* **8**, 4123-4129 (1^{er} nov. 2012).
152. LANGER, K. On the anatomy and physiology of the skin : I. The cleavability of the cutis. *British journal of plastic surgery* **31**, 3-8 (1978).
153. BROHEM, C. A. *et al.* Artificial skin in perspective : concepts and applications. *Pigment Cell & Melanoma Research* **24**, 35-50 (2010).
154. MEDAWAR, P. B. The Cultivation of Adult Mammalian Skin Epithelium In Vitro. *Journal of Cell Science* **s3-89**, 187-196 (1^{er} juin 1948).
155. KARASEK, M. A. & CHARLTON, M. E. Growth of Postembryonic Skin Epithelial Cells on Collagen Gels. *Journal of Investigative Dermatology* **56**, 205-210 (1^{er} mars 1971).
156. BELL, E., IVARSSON, B. & MERRILL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 1274-1278 (1^{er} mars 1979).
157. BERTHOD, F., HAYEK, D., DAMOUR, O. & COLLOMBEL, C. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials* **14**, 749-754 (1^{er} août 1993).
158. BERTHOD, F. *et al.* Collagen fibril network and elastic system remodeling in a reconstructed skin transplanted on nude mice. *Matrix Biology* **20**, 463-473 (1^{er} nov. 2001).
159. BROWN, R. A. In the beginning there were soft collagen-cell gels : towards better 3D connective tissue models? *Experimental Cell Research. Special Issue : Cell Motility and Mechanics* **319**, 2460-2469 (1^{er} oct. 2013).
160. HADJIPANAYI, E., MUDERA, V. & BROWN, R. A. Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **3**, 77-84 (2009).

161. LEE, W. *et al.* Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials* **30**, 1587-1595 (1^{er} mars 2009).
162. KOCH, L. *et al.* in *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (Second Edition)* (éd. ZHANG, L. G., FISHER, J. P. & LEONG, K. W.) 397-425 (Academic Press, 1^{er} jan. 2022).
163. POURCHET, L. *et al.* Large 3D bioprinted tissue : Heterogeneous perfusion and vascularization. *Bioprinting* **13**, e00039 (1^{er} mars 2019).
164. POURCHET, L. J. *et al.* Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Advanced Healthcare Materials* **6**, 1601101 (1^{er} fév. 2017).
165. SHIE, M.-Y. *et al.* Effects of Gelatin Methacrylate Bio-ink Concentration on Mechano-Physical Properties and Human Dermal Fibroblast Behavior. *Polymers* **12**, 1930 (sept. 2020).
166. CHEN, X. *et al.* 3D bioprinting dermal-like structures using species-specific ulvan. *Biomaterials Science* **9**, 2424-2438 (7 avr. 2021).
167. CUBO, N., GARCIA, M., CAÑIZO, J. F. d., VELASCO, D. & JORCANO, J. L. 3D bioprinting of functional human skin : production and in vivo analysis. *Biofabrication* **9**, 015006 (déc. 2016).
168. TUPIN, S. *et al.* Multiscale Approach to Characterize Mechanical Properties of Tissue Engineered Skin. *Annals of Biomedical Engineering* **44**, 2851-2862 (1^{er} sept. 2016).
169. PAILLER-MATTEI, C. *et al.* Rheological behaviour of reconstructed skin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **37**, 251-263 (1^{er} sept. 2014).
170. BLACK, A. F. *et al.* Optimization and Characterization of an Engineered Human Skin Equivalent. *Tissue Engineering* **11**, 723-733 (1^{er} mai 2005).
171. HADJIPANAYI, E., MUDERA, V. & BROWN, R. A. Guiding cell migration in 3D : A collagen matrix with graded directional stiffness. *Cell Motility* **66**, 121-128 (2009).
172. DAIKUARA, L. Y., YUE, Z., SKROPETA, D. & WALLACE, G. G. In vitro characterization of 3D printed platelet lysate-based bioink for potential application in skin tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **123**, 286-297 (15 mars 2021).
173. ASLAN, E. *et al.* Preliminary Characterization of a Polycaprolactone-SurgihoneyRO Electrospun Mesh for Skin Tissue Engineering. *Materials* **15**, 89 (jan. 2022).
174. IBAÑEZ, R. I. R. *et al.* 3D-Printed Gelatin Methacrylate Scaffolds with Controlled Architecture and Stiffness Modulate the Fibroblast Phenotype towards Dermal Regeneration. *Polymers* **13**, 2510 (jan. 2021).
175. KANG, H., ARYAL A.C., S. & MARINI, J. C. Osteogenesis imperfecta : new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Translational Research* **181**, 27-48 (1^{er} mars 2017).

176. FORLINO, A. & MARINI, J. C. Osteogenesis imperfecta. *The Lancet* **387**, 1657-1671 (16 avr. 2016).
177. SILENCE, D. O., SENN, A. & DANKS, D. M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *Journal of Medical Genetics* **16**, 101-116 (1^{er} avr. 1979).
178. VAN DIJK, F. S., PALS, G., VAN RIJN, R. R., NIKKELS, P. G. J. & COBBEN, J. M. Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. *European Journal of Medical Genetics* **53**, 1-5 (fév. 2010).
179. MARINI, J. C. & CABRAL, W. A. in *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease (Second Edition)* (éd. THAKKER, R. V., WHYTE, M. P., EISMAN, J. A. & IGARASHI, T.) 397-420 (Academic Press, 1^{er} jan. 2018).
180. MYLLYHARJU, J. & KIVIRIKKO, K. I. Collagens and collagen-related diseases. *Annals of Medicine* **33**, 7-21 (1^{er} jan. 2001).
181. FORLINO, A., CABRAL, W. A., BARNES, A. M. & MARINI, J. C. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nature Reviews Endocrinology* **7**, 540-557 (sept. 2011).
182. MARINI, J. C. *et al.* Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen : regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Human Mutation* **28**, 209-221 (2007).
183. GAJKO-GALICKA, A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. **49**, 9 (2002).
184. BISHOP, N. Bone Material Properties in Osteogenesis Imperfecta. *Journal of Bone and Mineral Research* **31**, 699-708 (2016).
185. IMBERT, L., AURÉGAN, J.-C., PERNELLE, K. & HOC, T. Mechanical and mineral properties of osteogenesis imperfecta human bones at the tissue level. *Bone* **65**, 18-24 (1^{er} août 2014).
186. IMBERT, L., AURÉGAN, J.-C., PERNELLE, K. & HOC, T. Microstructure and compressive mechanical properties of cortical bone in children with osteogenesis imperfecta treated with bisphosphonates compared with healthy children. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **46**, 261-270 (1^{er} juin 2015).
187. ECHARD, A. *Caractérisation multi-échelle du tissu osseux : Application à l'ostéogénèse imparfaite* thesis (Lyon, 21 nov. 2017).
188. WU, N. *et al.* The Progress of CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in Generating Mouse/Zebrafish Models of Human Skeletal Diseases. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **17**, 954-962 (1^{er} jan. 2019).
189. PHILLIPS, C. L. *et al.* Oim mice exhibit altered femur and incisor mineral composition and decreased bone mineral density. *Bone* **27**, 219-226 (1^{er} août 2000).
190. CAMACHO, N. P., LANDIS, W. J. & BOSKEY, A. L. Mineral Changes in a Mouse Model of Osteogenesis Imperfecta Detected by Fourier Transform Infrared Microscopy. *Connective Tissue Research* **35**, 259-265 (1^{er} jan. 1996).

191. CAMACHO, N. P. *et al.* The Material Basis for Reduced Mechanical Properties in oim Mice Bones. *Journal of Bone and Mineral Research* **14**, 264-272 (1999).
192. VANLEENE, M. *et al.* Ultra-structural defects cause low bone matrix stiffness despite high mineralization in osteogenesis imperfecta mice. *Bone* **50**, 1317-1323 (1^{er} juin 2012).
193. LI, H. *et al.* Immature Osteoblast Lineage Cells Increase Osteoclastogenesis in Osteogenesis Imperfecta Murine. *The American Journal of Pathology* **176**, 2405-2413 (1^{er} mai 2010).
194. KOZLOFF, K. M. *et al.* Brittle IV Mouse Model for Osteogenesis Imperfecta IV Demonstrates Postpubertal Adaptations to Improve Whole Bone Strength. *Journal of Bone and Mineral Research* **19**, 614-622 (2004).
195. FORLINO, A., PORTER, F. D., LEE, E. J., WESTPHAL, H. & MARINI, J. C. Use of the Cre/lox Recombination System to Develop a Non-lethal Knock-in Murine Model for Osteogenesis Imperfecta with an $\alpha 1(I)$ G349C Substitution : VARIABILITY IN PHENOTYPE IN BrtlIV MICE*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 37923-37931 (31 déc. 1999).
196. GIOIA, R. *et al.* Impaired Osteoblastogenesis in a Murine Model of Dominant Osteogenesis Imperfecta : A New Target for Osteogenesis Imperfecta Pharmacological Therapy. *STEM CELLS* **30**, 1465-1476 (1^{er} juill. 2012).
197. CHIPMAN, S. D. *et al.* Defective pro alpha 2(I) collagen synthesis in a recessive mutation in mice : a model of human osteogenesis imperfecta. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 1701-1705 (mars 1993).
198. RODRIGUEZ-FLOREZ, N. *et al.* An Investigation of the Mineral in Ductile and Brittle Cortical Mouse Bone. *Journal of Bone and Mineral Research* **30**, 786-795 (2015).
199. DALEY, E. *et al.* Variable bone fragility associated with an Amish COL1A2 variant and a knock-in mouse model. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**, 247-261 (2010).
200. MASCI, M. *et al.* Bone mineral properties in growing Col1a2+/G610C mice, an animal model of osteogenesis imperfecta. *Bone* **87**, 120-129 (1^{er} juin 2016).
201. LISSE, T. S. *et al.* ER Stress-Mediated Apoptosis in a New Mouse Model of Osteogenesis imperfecta. *PLOS Genetics* **4**, e7 (1^{er} fév. 2008).
202. BONADIO, J. *et al.* A murine skeletal adaptation that significantly increases cortical bone mechanical properties. Implications for human skeletal fragility. *The Journal of Clinical Investigation* **92**, 1697-1705 (1^{er} oct. 1993).
203. SCHNIEKE, A., HARBERS, K. & JAENISCH, R. Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the $\alpha 1(I)$ collagen gene. *Nature* **304**, 315-320 (juill. 1983).

204. HARBERS, K., KUEHN, M., DELIUS, H. & JAENISCH, R. Insertion of retrovirus into the first intron of alpha 1(I) collagen gene to embryonic lethal mutation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 1504-1508 (mars 1984).
205. ABDELAZIZ, D. M. *et al.* Behavioral signs of pain and functional impairment in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Bone. Epigenetic Mechanisms Regulating Bone Biology and Pathology* **81**, 400-406 (1^{er} déc. 2015).
206. TAUER, J. T., ABDULLAH, S. & RAUCH, F. Effect of Anti-TGF- β Treatment in a Mouse Model of Severe Osteogenesis Imperfecta. *Journal of Bone and Mineral Research* **34**, 207-214 (2019).
207. CHEN, F. *et al.* First Mouse Model for Combined Osteogenesis Imperfecta and Ehlers-Danlos Syndrome. *Journal of Bone and Mineral Research* **29**, 1412-1423 (2014).
208. Van EEDEN, F. *et al.* Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 255-262 (1^{er} déc. 1996).
209. ASHARANI, P. V. *et al.* Attenuated BMP1 Function Compromises Osteogenesis, Leading to Bone Fragility in Humans and Zebrafish. *The American Journal of Human Genetics* **90**, 661-674 (6 avr. 2012).
210. FISHER, S., JAGADEESWARAN, P. & HALPERN, M. E. Radiographic analysis of zebrafish skeletal defects. *Developmental Biology* **264**, 64-76 (1^{er} déc. 2003).
211. GALICKA, A., WOLCZYNSKI, S. & GINDZIENSKI, A. Comparative studies of osteoblast and fibroblast type I collagen in a patient with osteogenesis imperfecta type IV. *The Journal of Pathology* **196**, 235-237 (1^{er} fév. 2002).
212. CHIPMAN, S. D. *et al.* Expression of mutant α (I)-procollagen in osteoblast and fibroblast cultures from a proband with osteogenesis imperfecta type IV. *Journal of Bone and Mineral Research* **7**, 793-805 (1^{er} juill. 1992).
213. FEDARKO, N. S., MOERIKE, M., BRENNER, R., ROBNEY, P. G. & VETTER, U. Extracellular matrix formation by osteoblasts from patients with osteogenesis imperfecta. *Journal of Bone and Mineral Research* **7**, 921-930 (1^{er} août 1992).
214. LAMANDÉ, S. R. *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated quality control of type I collagen production by cells from osteogenesis imperfecta patients with mutations in the pro alpha 1 (I) chain carboxyl-terminal propeptide which impair subunit assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 8642-8649 (14 avr. 1995).
215. BRENNER, R. E. *et al.* Osteogenesis imperfecta : insufficient collagen synthesis in early childhood as evidenced by analysis of compact bone and fibroblast cultures. *European Journal of Clinical Investigation* **19**, 159-166 (1^{er} avr. 1989).
216. PENTTINEN, R. P., LICHTENSTEIN, J. R., MARTIN, G. R. & MCKUSICK, V. A. Abnormal collagen metabolism in cultured cells in osteogenesis imperfecta. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**, 586-589 (1^{er} fév. 1975).

217. BRENNER, R. E. *et al.* Altered collagen metabolism in osteogenesis imperfecta fibroblasts : a study on 33 patients with diverse forms. *European Journal of Clinical Investigation* **20**, 8-14 (1^{er} fév. 1990).
218. FEDARKO, N. S., ROBNEY, P. G. & VETTER, U. K. Extracellular matrix stoichiometry in osteoblasts from patients with osteogenesis imperfecta. *Journal of Bone and Mineral Research* **10**, 1122-1129 (1995).
219. KANETO, C. M. *et al.* Gene expression profiling of bone marrow mesenchymal stem cells from Osteogenesis Imperfecta patients during osteoblast differentiation. *European Journal of Medical Genetics* **60**, 326-334 (1^{er} juin 2017).
220. MÖRIKE, M., BRENNER, R. E., BUSHART, G. B., TELLER, W. M. & VETTER, U. Collagen metabolism in cultured osteoblasts from osteogenesis imperfecta patients. *Biochemical Journal* **286**, 73-77 (15 août 1992).
221. BORIGHT, A. P., LANCASTER, G. A. & SCRIVER, C. R. Osteogenesis imperfecta : a heterogeneous morphologic phenotype in cultured dermal fibroblasts. *Human Genetics* **67**, 29-33 (1^{er} juin 1984).
222. TURAKAINEN, H. Altered glycosaminoglycan production in cultured osteogenesis-imperfecta skin fibroblasts. *The Biochemical journal* **213**, 171-178 (1^{er} juill. 1983).
223. HSU, P. D., LANDER, E. S. & ZHANG, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* **157**, 1262-1278 (5 juin 2014).
224. ROBB, G. B. Genome Editing with CRISPR-Cas : An Overview. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* **19**, e36 (2019).
225. RAN, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* **8**, 2281-2308 (nov. 2013).
226. GAGNON, J. A. *et al.* Efficient Mutagenesis by Cas9 Protein-Mediated Oligonucleotide Insertion and Large-Scale Assessment of Single-Guide RNAs. *PLOS ONE* **9**, e98186 (29 mai 2014).
227. LABUHN, M. *et al.* Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Research* **46**, 1375-1385 (16 fév. 2018).
228. SANDER, J. D. & JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* **32**, 347-355 (avr. 2014).
229. JUNG, H., RIM, Y. A., PARK, N., NAM, Y. & JU, J. H. Restoration of Osteogenesis by CRISPR/Cas9 Genome Editing of the Mutated COL1A1 Gene in Osteogenesis Imperfecta. *Journal of Clinical Medicine* **10**, 3141 (jan. 2021).
230. HOWDEN, S. E. *et al.* A Cas9 Variant for Efficient Generation of Indel-Free Knockin or Gene-Corrected Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **7**, 508-517 (4 août 2016).

231. HOSSEINI FAR, H. *et al.* Generation of a heterozygous COL1A1 (c.3969_3970insT) osteogenesis imperfecta mutation human iPSC line, MCRI001-A-1, using CRISPR/Cas9 editing. *Stem Cell Research* **37**, 101449 (1^{er} mai 2019).
232. MA, S., SALEEM, A., LI, X., LU, W.-J. & JIANG, H. Generation of a COL1A2 homozygous knockout stem cell line via CRISPR/Cas9 system. *Stem Cell Research* **59**, 102652 (1^{er} mars 2022).
233. LEONI, L. *et al.* Knocking out TMEM38B in human foetal osteoblasts hFOB 1.19 by CRISPR/Cas9 : A model for recessive OI type XIV. *PLOS ONE* **16**, e0257254 (28 sept. 2021).
234. KANG, H. & MARINI, J. *CRISPR/Cas9-mediated IFITM5 gene editing demonstrates that BRIL (Ser40Leu) substitution suppresses PEDF-mediated activation of PPAR γ* in. 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress (BioScientifica, 21 avr. 2016).
235. KANG, H. *et al.* Antagonism Between PEDF and TGF- β Contributes to Type VI Osteogenesis Imperfecta Bone and Vascular Pathogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research* **37**, 925-937 (2022).
236. JAMES, S. *et al.* Multiparameter Analysis of Human Bone Marrow Stromal Cells Identifies Distinct Immunomodulatory and Differentiation-Competent Subtypes. *Stem Cell Reports* **4**, 1004-1015 (juin 2015).
237. MARQUETTE, C., POURCHET, L., THEPOT, A. & DOS SANTOS, M. *brev.* (2017).
238. BOUDAUD, A. *et al.* FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. *Nature Protocols* **9**, 457-463 (2014).
239. BANO, N., JIKAN, S. S., BASRI, H., BAKAR, S. A. A. & NUHU, A. H. Natural Hydroxyapatite Extracted From Bovine Bone. *Journal of Science and Technology* **9** (21 déc. 2017).
240. STANCIUC, A.-M. *et al.* Human primary osteoblast behaviour on microrough zirconia-toughened alumina and on selectively etched microrough zirconia-toughened alumina. *Journal of the European Ceramic Society* **38**, 927-937 (mars 2018).
241. COURTIAL, E. *et al.* Hyper-Viscoelastic Behavior of Healthy Abdominal Aorta. *IRBM* **37**, 158-164 (1^{er} juin 2016).
242. SNEDDON, I. N. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science* **3**, 47-57 (1^{er} mai 1965).
243. CARVALHO, F. A. & SANTOS, N. C. Atomic force microscopy-based force spectroscopy — biological and biomedical applications. *IUBMB Life* **64**, 465-472 (2012).
244. JOHNSON, D., HILAL, N. & BOWEN, W. R. in *Atomic Force Microscopy in Process Engineering* (éd. BOWEN, W. R. & HILAL, N.) 1-30 (Butterworth-Heinemann, Oxford, 1^{er} jan. 2009).

-
245. CACCAVO, D., CASCONI, S., LAMBERTI, G. & BARBA, A. Hydrogels : Experimental characterization and mathematical modelling of their mechanical and diffusive behaviour. *Chemical Society Reviews* **47**, 2357-2373 (2018).
246. LIU, Y. *et al.* Tunable physical and mechanical properties of gelatin hydrogel after transglutaminase crosslinking on two gelatin types. *International Journal of Biological Macromolecules* **162**, 405-413 (1^{er} nov. 2020).
247. BRODERICK, E. P. *et al.* Enzymatic stabilization of gelatin-based scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials* **72B**, 37-42 (2005).
248. BODE, F., da SILVA, M. A., DRAKE, A. F., ROSS-MURPHY, S. B. & DREISS, C. A. Enzymatically Cross-Linked Tilapia Gelatin Hydrogels : Physical, Chemical, and Hybrid Networks. *Biomacromolecules* **12**, 3741-3752 (10 oct. 2011).
249. EBENSTEIN, D. M. Nano-JKR force curve method overcomes challenges of surface detection and adhesion for nanoindentation of a compliant polymer in air and water. *Journal of Materials Research* **26**, 1026-1035 (avr. 2011).
250. KOHN, J. C. & EBENSTEIN, D. M. Eliminating adhesion errors in nanoindentation of compliant polymers and hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **20**, 316-326 (1^{er} avr. 2013).
251. IRVINE, S. A. *et al.* Printing cell-laden gelatin constructs by free-form fabrication and enzymatic protein crosslinking. *Biomedical Microdevices* **17**, 16 (1^{er} fév. 2015).
252. BABIN, H. & DICKINSON, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. *Food Hydrocolloids* **15**, 271-276 (1^{er} mai 2001).
253. ALARAKE, N. Z., FROHBERG, P., GROTH, T. & PIETZSCH, M. Mechanical Properties and Biocompatibility of in Situ Enzymatically Cross-Linked Gelatin Hydrogels. *The International Journal of Artificial Organs* **40**, 159-168 (1^{er} avr. 2017).
254. GUPTA, D., SANTOSO, J. W. & MCCAIN, M. L. Characterization of Gelatin Hydrogels Cross-Linked with Microbial Transglutaminase as Engineered Skeletal Muscle Substrates. *Bioengineering* **8**, 6 (jan. 2021).
255. ZHAO, X., HUEBSCH, N., MOONEY, D. J. & SUO, Z. Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks. *Journal of Applied Physics* **107**, 063509 (15 mars 2010).
256. AHEARNE, M., YANG, Y., EL HAJ, A. J., THEN, K. Y. & LIU, K.-K. Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *Journal of The Royal Society Interface* **2**, 455-463 (22 déc. 2005).
257. CHAUDHURI, O. *et al.* Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nature Materials* **15**, 326-334 (mars 2016).
258. DRURY, J. L., DENNIS, R. G. & MOONEY, D. J. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* **25**, 3187-3199 (1^{er} juill. 2004).

259. KUO, C. K. & MA, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering : Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* **22**, 511-521 (15 mars 2001).
260. KAKLAMANI, G., CHENELER, D., GROVER, L. M., ADAMS, M. J. & BOWEN, J. Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **36**, 135-142 (1^{er} août 2014).
261. CRESCENZI, V., FRANCESCANGELI, A. & TAGLIENTI, A. New Gelatin-Based Hydrogels via Enzymatic Networking. *Biomacromolecules* **3**, 1384-1391 (1^{er} nov. 2002).
262. BERTONI, F., BARBANI, N., GIUSTI, P. & CIARDELLI, G. Transglutaminase Reactivity with Gelatine : Perspective Applications in Tissue Engineering. *Biotechnology Letters* **28**, 697-702 (mai 2006).
263. CHAU, D. Y. S., COLLIGHAN, R. J., VERDERIO, E. A. M., ADDY, V. L. & GRIFFIN, M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials* **26**, 6518-6529 (1^{er} nov. 2005).
264. BARTNIKOWSKI, M., WELLARD, R. M., WOODRUFF, M. & KLEIN, T. Tailoring Hydrogel Viscoelasticity with Physical and Chemical Crosslinking. *Polymers* **7**, 2650-2669 (déc. 2015).
265. CAMERON, A. R., FRITH, J. E. & COOPER-WHITE, J. J. The influence of substrate creep on mesenchymal stem cell behaviour and phenotype. *Biomaterials* **32**, 5979-5993 (1^{er} sept. 2011).
266. FITZGERALD, M. M., BOOTSMA, K., BERBERICH, J. A. & SPARKS, J. L. Tunable Stress Relaxation Behavior of an Alginate-Polyacrylamide Hydrogel : Comparison with Muscle Tissue. *Biomacromolecules* **16**, 1497-1505 (11 mai 2015).
267. VENTURONI, M., GUTSMANN, T., FANTNER, G. E., KINDT, J. H. & HANSMA, P. K. Investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**, 508-513 (4 avr. 2003).
268. BENIASH, E., TRAUB, W., VEIS, A. & WEINER, S. A Transmission Electron Microscope Study Using Vitrified Ice Sections of Predentin : Structural Changes in the Dentin Collagenous Matrix prior to Mineralization. *Journal of Structural Biology* **132**, 212-225 (1^{er} déc. 2000).
269. HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews. MOST CITED PAPERS IN THE HISTORY OF ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS : A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL* **64**, 18-23 (1^{er} déc. 2012).
270. AMIZUKA, N. *et al.* Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Frontiers in Bioscience-Elite* **4**, 2085-2100 (1^{er} jan. 2012).

271. THÉRY, M. *et al.* Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19771-19776 (26 déc. 2006).
272. DYSON, R. J., GREEN, J. E. F., WHITELEY, J. P. & BYRNE, H. M. An investigation of the influence of extracellular matrix anisotropy and cell-matrix interactions on tissue architecture. *Journal of Mathematical Biology* **72**, 1775-1809 (1^{er} juin 2016).
273. BRANCO DA CUNHA, C. *et al.* Influence of the stiffness of three-dimensional alginate/collagen-I interpenetrating networks on fibroblast biology. *Biomaterials* **35**, 8927-8936 (1^{er} oct. 2014).
274. BLAESER, A. *et al.* Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Advanced Healthcare Materials* **5**, 326-333 (2016).
275. NEUFURTH, M. *et al.* 3D bioprinting of tissue units with mesenchymal stem cells, retaining their proliferative and differentiating potential, in polyphosphate-containing bio-ink. *Biofabrication* **14**, 015016 (2022).
276. QUENT, V. M., LOESSNER, D., FRIIS, T., REICHERT, J. C. & HUTMACHER, D. W. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14**, 1003-1013 (2010).
277. NG, K. W., LEONG, D. T. & HUTMACHER, D. W. The Challenge to Measure Cell Proliferation in Two and Three Dimensions. *Tissue Engineering* **11**, 182-191 (1^{er} jan. 2005).
278. SONNAERT, M., PAPANTONIOU, I., LUYTEN, F. P. & SCHROOTEN, J. Quantitative Validation of the Presto Blue™ Metabolic Assay for Online Monitoring of Cell Proliferation in a 3D Perfusion Bioreactor System. *Tissue Engineering Part C : Methods* **21**, 519-529 (1^{er} juin 2015).
279. HWANG, P. W. & HORTON, J. A. Variable osteogenic performance of MC3T3-E1 subclones impacts their utility as models of osteoblast biology. *Scientific Reports* **9**, 8299 (5 juin 2019).
280. BUXTON, P. *et al.* Dense collagen matrix accelerates osteogenic differentiation and rescues the apoptotic response to MMP inhibition. *Bone* **43**, 377-385 (août 2008).
281. MC GARRIGLE, M. J., MULLEN, C. A., HAUGH, M. G., VOISIN, M. C. & MCNAMARA, L. M. Osteocyte differentiation and the formation of an interconnected cellular network in vitro. *European Cells & Materials* **31**, 323-340 (24 mai 2016).
282. KINNER, B. & SPECTOR, M. Expression of smooth muscle actin in osteoblasts in human bone. *Journal of Orthopaedic Research* **20**, 622-632 (2002).
283. BOSETTI, M., BORRONE, A., LEIGHEB, M., SHASTRI, V. P. & CANNAS, M. Injectable Graft Substitute Active on Bone Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part A* **23**, 1413-1422 (déc. 2017).

284. EASTWOOD, M., PORTER, R., KHAN, U., MCGROUTHER, G. & BROWN, R. Quantitative analysis of collagen gel contractile forces generated by dermal fibroblasts and the relationship to cell morphology. *Journal of Cellular Physiology* **166**, 33-42 (1996).
285. FERNANDEZ, P. & BAUSCH, A. R. The compaction of gels by cells : a case of collective mechanical activity. *Integrative Biology* **1**, 252-259 (1^{er} mars 2009).
286. KONG, H. J., POLTE, T. R., ALSBERG, E. & MOONEY, D. J. FRET measurements of cell-traction forces and nano-scale clustering of adhesion ligands varied by substrate stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 4300-4305 (22 mars 2005).
287. MENARD, C., MITCHELL, S. & SPECTOR, M. Contractile behavior of smooth muscle actin-containing osteoblasts in collagen-GAG matrices in vitro : implant-related cell contraction. *Biomaterials* **21**, 1867-1877 (1^{er} sept. 2000).
288. POELLMANN, M. J. *et al.* Differences in Morphology and Traction Generation of Cell Lines Representing Different Stages of Osteogenesis. *Journal of Biomechanical Engineering* **137** (3 nov. 2015).
289. CHAUDHRY, M. A., BOWEN, B. D. & PIRET, J. M. Culture pH and osmolality influence proliferation and embryoid body yields of murine embryonic stem cells. *Biochemical Engineering Journal* **45**, 126-135 (15 juill. 2009).
290. MAVROGONATOU, E. & KLETSAS, D. High osmolality activates the G1 and G2 cell cycle checkpoints and affects the DNA integrity of nucleus pulposus intervertebral disc cells triggering an enhanced DNA repair response. *DNA Repair* **8**, 930-943 (6 août 2009).
291. MICHEA, L. *et al.* Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **278**, F209-F218 (fév. 2000).
292. HUEBSCH, N. *et al.* Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nature Materials* **9**, 518-526 (juin 2010).
293. CHAUDHURI, O. *et al.* Substrate stress relaxation regulates cell spreading. *Nature Communications* **6**, 6365 (19 fév. 2015).
294. MAEDA, M., MATSUZAKI, T., AKAI, F., HASHIMOTO, S. & TAKAGI, H. Occurrence of long-spacing collagen in the intramuscular nerves of biopsied muscle tissues. *Medical Electron Microscopy* **29**, 124-128 (1^{er} déc. 1996).
295. LIN, A. C. & GOH, M. C. Investigating the ultrastructure of fibrous long spacing collagen by parallel atomic force and transmission electron microscopy. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics* **49**, 378-384 (2002).
296. PAIGE, M. F., RAINEY, J. K. & GOH, M. C. A study of fibrous long spacing collagen ultrastructure and assembly by atomic force microscopy. *Micron* **32**, 341-353 (1^{er} avr. 2001).

-
297. WEN, C. K. & GOH, M. C. Fibrous long spacing type collagen fibrils have a hierarchical internal structure. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics* **64**, 227-233 (2006).
298. KOBAYASI, T., ASBOE-HANSEN, G. & TSURUFUJI, S. Filamentous aggregates of collagen. Ultrastructural evidence for collagen-fibril degradation in situ. *Archives of Dermatological Research* **277**, 214-219 (1^{er} fév. 1985).
299. KAJIKAWA, K., NAKANISHI, I. & YAMAMURA, T. The effect of collagenase on the formation of fibrous long spacing collagen aggregates. *Laboratory investigation ; a journal of technical methods and pathology* **43**, 410-417 (1^{er} nov. 1980).
300. MIKI, H., UNNO, K., PARK, P., OHNO, T. & NAKAJIMA, M. Morphogenesis and origin of fibrous long-spacing collagen fibers in collagenase-treated mouse skin tissues. *Tissue and Cell* **25**, 669-680 (1^{er} oct. 1993).
301. AKIVA, A. *et al.* An Organoid for Woven Bone. *Advanced Functional Materials* **n/a**, 2010524 (n/a 9 mars 2021).
302. ZHU, G. *et al.* Bone physiological microenvironment and healing mechanism : Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials* **6**, 4110-4140 (1^{er} nov. 2021).
303. BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**, 229-238 (2011).
304. LEE, W.-C., JI, X., NISSIM, I. & LONG, F. Malic Enzyme Couples Mitochondria with Aerobic Glycolysis in Osteoblasts. *Cell Reports* **32**, 108108 (8 sept. 2020).
305. MISRA, B. B., JAYAPALAN, S., RICHARDS, A. K., HELDERMAN, R. C. M. & RENDINA-RUEDY, E. Untargeted metabolomics in primary murine bone marrow stromal cells reveals distinct profile throughout osteoblast differentiation. *Metabolomics* **17**, 86 (18 sept. 2021).
306. KIM, W. *et al.* A multicellular bioprinted cell construct for vascularized bone tissue regeneration. *Chemical Engineering Journal* **431**, 133882 (1^{er} mars 2022).
307. GARCIA, P. D. & GARCIA, R. Determination of the viscoelastic properties of a single cell cultured on a rigid support by force microscopy. *Nanoscale* **10**, 19799-19809 (1^{er} nov. 2018).
308. GARCIA, P. D. & GARCIA, R. Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy. *Biophysical Journal* **114**, 2923-2932 (19 juin 2018).
309. TRAPPMANN, B. *et al.* Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nature Materials* **11**, 642-649 (juill. 2012).
310. OUYANG, L., WOJCIECHOWSKI, J. P., TANG, J., GUO, Y. & STEVENS, M. M. Tunable Microgel-Templated Porogel (MTP) Bioink for 3D Bioprinting Applications. *Advanced Healthcare Materials* **n/a**, 2200027 (n/a 2022).

311. CHOUDHARY, S. *et al.* Hypoxic Three-Dimensional Cellular Network Construction Replicates Ex Vivo the Phenotype of Primary Human Osteocytes. *Tissue Engineering Part A* **24**, 458-468 (8 juin 2017).
312. ALSBERG, E. *et al.* Regulating Bone Formation via Controlled Scaffold Degradation. *Journal of Dental Research* **82**, 903-908 (1^{er} nov. 2003).
313. LUTOLF, M. P. *et al.* Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nature Biotechnology* **21**, 513-518 (mai 2003).
314. REZNIKOV, N., SHAHAR, R. & WEINER, S. Three-dimensional structure of human lamellar bone : The presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization. *Bone* **59**, 93-104 (1^{er} fév. 2014).
315. BANGASSER, B. L. *et al.* Shifting the optimal stiffness for cell migration. *Nature Communications* **8**, 15313 (22 mai 2017).
316. JIN, T., LI, L., SIOW, R. C. & LIU, K.-K. Collagen matrix stiffness influences fibroblast contraction force. *Biomedical Physics & Engineering Express* **2**, 047002 (juill. 2016).
317. KARAMICHOS, D., BROWN, R. & MUDERA, V. Collagen stiffness regulates cellular contraction and matrix remodeling gene expression. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **83A**, 887-894 (2007).
318. LUTOLF, M. P. *et al.* Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration : Engineering cell-invasion characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 5413-5418 (29 avr. 2003).
319. TSCHUMPERLIN, D. J. Fibroblasts and the Ground They Walk On. *Physiology* **28**, 380-390 (1^{er} nov. 2013).
320. HINZ, B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 526-537 (1^{er} mars 2007).
321. HINZ, B., MASTRANGELO, D., ISELIN, C. E., CHAPONNIER, C. & GABBIANI, G. Mechanical Tension Controls Granulation Tissue Contractile Activity and Myofibroblast Differentiation. *The American Journal of Pathology* **159**, 1009-1020 (1^{er} sept. 2001).
322. GOFFIN, J. M. *et al.* Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of α -smooth muscle actin to stress fibers. *Journal of Cell Biology* **172**, 259-268 (9 jan. 2006).
323. GERMAIN, L., JEAN, A., AUGER, F. A. & GARREL, D. R. Human Wound Healing Fibroblasts Have Greater Contractile Properties Than Dermal Fibroblasts. *Journal of Surgical Research* **57**, 268-273 (1^{er} août 1994).
324. GRIFFIN, M. F., DESJARDINS-PARK, H. E., MASCHARAK, S., BORRELLI, M. R. & LONGAKER, M. T. Understanding the impact of fibroblast heterogeneity on skin fibrosis. *Disease Models & Mechanisms* **13**, dmm044164 (17 juin 2020).

-
325. HEDMAN, K. *et al.* Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. *Journal of Cell Biology* **81**, 83-91 (1^{er} avr. 1979).
326. WILKINSON, H. N. & HARDMAN, M. J. Wound healing : cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology* **10**, 200223 (2020).
327. STUNOVA, A. & VISTEJNOVA, L. Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **39**, 137-150 (1^{er} fév. 2018).
328. PHARR, G. M. & OLIVER, W. C. Measurement of Thin Film Mechanical Properties Using Nanoindentation. *MRS Bulletin* **17**, 28-33 (juill. 1992).
329. WEIGEL, T. *et al.* Fully Synthetic 3D Fibrous Scaffolds for Stromal Tissues—Replacement of Animal-Derived Scaffold Materials Demonstrated by Multilayered Skin. *Advanced Materials* **n/a**, 2106780 (n/a 2022).
330. SCHNEIDER, M. C. *et al.* Local Heterogeneities Improve Matrix Connectivity in Degradable and Photoclickable Poly(ethylene glycol) Hydrogels for Applications in Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **3**, 2480-2492 (9 oct. 2017).
331. AISENBREY, E. A. & BRYANT, S. J. A MMP7-sensitive photoclickable biomimetic hydrogel for MSC encapsulation towards engineering human cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **106**, 2344-2355 (2018).
332. DIMITRIADIS, E. K., HORKAY, F., MARESCA, J., KACHAR, B. & CHADWICK, R. S. Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal* **82**, 2798-2810 (1^{er} mai 2002).
333. DOSS, B. L., ELIATO, K. R., LIN, K.-h. & ROS, R. Quantitative mechanical analysis of indentations on layered, soft elastic materials. *Soft Matter* **15**, 1776-1784 (20 fév. 2019).
334. BEC, S., TONCK, A., GEORGES, J.-M., GEORGES, E. & LOUBET, J.-L. Improvements in the indentation method with a surface force apparatus. *Philosophical Magazine A* **74**, 1061-1072 (nov. 1996).
335. BEC, S. *et al.* Relationship between mechanical properties and structures of zinc dithiophosphate anti-wear films. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **455**, 4181-4203 (8 déc. 1999).
336. MERSON, J., PARVEZ, N. & PICU, R. C. Probing soft fibrous materials by indentation. *Acta Biomaterialia* (2 avr. 2022).
337. FINAN, J. D., FOX, P. M. & MORRISON, B. Non-ideal effects in indentation testing of soft tissues. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **13**, 573-584 (1^{er} juin 2014).
338. CHIODINI, S. *et al.* Bottom Effect in Atomic Force Microscopy Nanomechanics. *Small* **16**, 2000269 (2020).

339. EFREMOV, Y. M., WANG, W.-H., HARDY, S. D., GEHLEN, R. L. & RAMAN, A. Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from AFM force-displacement curves. *Scientific Reports* **7**, 1541 (8 mai 2017).
340. BRÜCKNER, B. R., NÖDING, H. & JANSHOFF, A. Viscoelastic Properties of Confluent MDCK II Cells Obtained from Force Cycle Experiments. *Biophysical Journal* **112**, 724-735 (28 fév. 2017).
341. TING, T. C. T. The Contact Stresses Between a Rigid Indenter and a Viscoelastic Half-Space. *Journal of Applied Mechanics* **33**, 845-854 (1^{er} déc. 1966).
342. EFREMOV, Y. M., KOTOVA, S. L. & TIMASHEV, P. S. Viscoelasticity in simple indentation-cycle experiments : a computational study. *Scientific Reports* **10**, 13302 (6 août 2020).
343. CHENG, Y.-T. & CHENG, C.-M. General relationship between contact stiffness, contact depth, and mechanical properties for indentation in linear viscoelastic solids using axisymmetric indenters of arbitrary profiles. *Applied Physics Letters* **87**, 111914 (12 sept. 2005).
344. GARCIA, P. D., GUERRERO, C. R. & GARCIA, R. Nanorheology of living cells measured by AFM-based force-distance curves. *Nanoscale* **12**, 9133-9143 (30 avr. 2020).
345. BOYER, G. *et al.* Non contact method for in vivo assessment of skin mechanical properties for assessing effect of ageing. *Medical Engineering & Physics* **34**, 172-178 (1^{er} mars 2012).
346. BALBOUS, A. *et al.* A mesenchymal glioma stem cell profile is related to clinical outcome. *Oncogenesis* **3**, e91-e91 (mars 2014).
347. *A Database of Osteogenesis Imperfecta and Ehlers Danlos Syndrome Variants* <https://www.le.ac.uk/genetics/collagen/> (2018).
348. CONCORDET, J.-P. & HAEUSSLER, M. CRISPOR : intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research* **46**, W242-W245 (W1 2 juill. 2018).
349. SUBRAMANIAM, M. *et al.* Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER α cells : Bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. *Journal of Cellular Biochemistry* **87**, 9-15 (2002).
350. LI, Z., ZHOU, Z., SAUNDERS, M. M. & DONAHUE, H. J. Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **290**, C1248-C1255 (1^{er} avr. 2006).
351. IGNATIUS, A. *et al.* Tissue engineering of bone : effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials* **26**, 311-318 (1^{er} jan. 2005).

352. YEN, M.-I. *et al.* Multilineage Differentiation and Characterization of the Human Fetal Osteoblastic 1.19 Cell Line : A Possible In Vitro Model of Human Mesenchymal Progenitors. *STEM CELLS* **25**, 125-131 (2007).
353. HENAFF, C. L., PARTRIDGE, N., JEHAN, F. & GEOFFROY, V. *Identification of epigenomic regulators of osteoblast function* in. 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress (BioScientifica, 21 avr. 2016).
354. CHEN, X.-F. *et al.* An Osteoporosis Risk SNP at 1p36.12 Acts as an Allele-Specific Enhancer to Modulate LINC00339 Expression via Long-Range Loop Formation. *The American Journal of Human Genetics* **102**, 776-793 (3 mai 2018).
355. RIBEIRO, R. d. C. *et al.* Reactive jet impingement bioprinting of high cell density gels for bone microtissue fabrication. *Biofabrication* **11**, 015014 (déc. 2018).
356. HOWDEN, S. *et al.* The use of simultaneous reprogramming and gene correction to generate an osteogenesis imperfecta patient COL1A1 c. 3936 G>T iPSC line and an isogenic control iPSC line. *Stem Cell Research* **38**, 101453 (1^{er} juill. 2019).
357. JAISWAL, K. R. *et al.* Characterization of telomerase-immortalized, non-neoplastic, human Barrett's cell line (BAR-T). *Diseases of the Esophagus* **20**, 256-264 (1^{er} juin 2007).
358. OUELLETTE, M. M., MCDANIEL, L. D., WRIGHT, W. E., SHAY, J. W. & SCHULTZ, R. A. The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. *Human Molecular Genetics* **9**, 403-411 (12 fév. 2000).
359. JIANG, X.-R. *et al.* Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nature Genetics* **21**, 111-114 (jan. 1999).
360. MORALES, C. P. *et al.* Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genetics* **21**, 115-118 (jan. 1999).
361. LA GATTA, A. *et al.* Hyaluronan Hydrogels for Injection in Superficial Dermal Layers : An In Vitro Characterization to Compare Performance and Unravel the Scientific Basis of Their Indication. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 6005 (jan. 2021).
362. D'AGOSTINO, A. *et al.* Potential of Biofermentative Unsulfated Chondroitin and Hyaluronic Acid in Dermal Repair. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 1686 (jan. 2022).
363. SZYMAŃSKI, Ł. *et al.* A Simple Method for the Production of Human Skin Equivalent in 3D, Multi-Cell Culture. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 4644 (jan. 2020).
364. STEINBERG, B. M., SMITH, K., COLOZZO, M. & POLLACK, R. Establishment and transformation diminish the ability of fibroblasts to contract a native collagen gel. *Journal of Cell Biology* **87**, 304-308 (1^{er} oct. 1980).

365. LIU, T. *et al.* Conditional Knockout of Telomerase Reverse Transcriptase in Mesenchymal Cells Impairs Mouse Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE* **10**, e0142547 (10 nov. 2015).
366. AHMED, T. *et al.* Combining nano-physical and computational investigations to understand the nature of “aging” in dermal collagen. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 3303-3314 (21 avr. 2017).

Résumé

L'ostéogenèse imparfaite (OI), est une maladie rare causée par une mutation génétique portée par un des gènes qui encodent le collagène de type I. Elle est caractérisée par une fragilité accrue des os. Bien que la peau soit également riche en collagène I, les effets des mutations responsables de l'OI semblent mineurs sur cet organe. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans un projet consistant à établir un lien entre les effets de l'ostéogenèse imparfaite sur les tissus osseux et dermiques. Cette étude a nécessité de décrire ces tissus d'un point de vue biomécanique et de leur physiologie cellulaire.

Ce travail propose donc de développer des modèles d'étude *in vitro* en trois dimensions pour les tissus osseux et cutanés. En effet, cette étape est nécessaire à la compréhension du lien os-peau dans le cas de l'OI. Nous avons ainsi pu déterminer les propriétés mécaniques et structurales optimales de construits bio-imprimés pour permettre le développement de modèles de tissu osseux et de derme *in vitro*. La génération de ces modèles a également nécessité d'adapter les méthodes de caractérisation biomécanique existantes pour les explants aux spécificités de nos nouveaux modèles. Nous avons montré que l'essai d'indentation permettait de mesurer à la fois les propriétés élastiques et viscoélastiques des construits bio-imprimés. Nous avons également quantifié les forces de traction générées par les cellules et responsables de la contraction macroscopique des construits. Dans une dernière partie, les stratégies utilisées pour produire des modèles cellulaires OI ont été présentées. Les modèles de tissu osseux et de derme produits dans le cadre de ces travaux pourront donc servir à étudier l'OI, mais également d'autres pathologies du collagène I telle que l'ostéoporose.

Mots clés : collagène I, bio-impression, os, derme, ingénierie tissulaire, indentation, biomécanique, ostéogenèse imparfaite, module d'élasticité, viscoélasticité, force de traction

Abstract

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare disease caused by a genetic mutation carried by one of the genes that encode type I collagen. It is characterized by increased bone fragility. Although skin is also rich in collagen I, the effects of the mutations responsible for OI appear to be minor on this organ. This thesis work is part of a project consisting in establishing a link between the effects of osteogenesis imperfecta on bone and dermal tissues. This study required to describe these tissues from a biomechanical point of view and their cellular physiology.

This work therefore offers to develop *in vitro* models in three dimensions for bone and skin tissue. Indeed, this step is necessary to understand the bone-skin link in the case of OI. We were thus able to determine the optimal mechanical and structural properties of bio-printed constructs to allow the development of models of bone tissue and dermis *in vitro*. The generation of these models also required adapting existing biomechanical characterization methods for explants to the specificities of our new models. We showed that indentation test can measure both elastic and viscoelastic properties of bioprinted constructs. We also quantified the traction forces generated by the cells and responsible for the macroscopic contraction of the constructs. In a last part, the strategies used to produce OI cell models were presented. The models of bone tissue and dermis produced within the framework of this work could therefore be used to study OI, but also other pathologies of collagen I such as osteoporosis.

Keywords : collagen I, bioprinting, bone, dermis, tissue engineering, indentation, biomechanics, osteogenesis imperfecta, elastic modulus, viscoelasticity, traction force

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 25 mai 2016,

Vu la demande du directeur de thèse

Monsieur C. PAILLER-MATTEI

et les rapports de

M. P. CHABRAND
Professeur - Université Aix-Marseille

et de

M. R. DEBRET
Directeur de Recherche CNRS - LBTI - IBCP

Madame PRAGNERE Sarah

est autorisée à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale Mécanique, Energétique, Génie civil, Acoustique

Fait à Ecully, le 9 septembre 2022

Pour le directeur de l'Ecole centrale de Lyon
Le directeur des Formations

Grégory VIAL

